Untersuchungen über mitochondriale DNA-Polymerase und über Wirkungen von Cyclophosphamid

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
im Fachbereich Chemie
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Knut Engels
aus Berlin

1972

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41547025_0054

Untersuchungen über mitochondriale DNA-Polymerase und über Wirkungen von Cyclophosphamid

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
im Fachbereich Chemie
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Knut Engels
aus Berlin

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Referent: Prof. Dr. G. Koßmehl

Korreferent: Prof. Dr. D. Neubert

Tag der mündlichen Prüfung: 24. Februar 1972

Aus dem Pharmakologischen Institut

der Freien Universität Berlin

Direktor: Professor Dr. med. Hans Herken

INHALTSVERZEICHNIS

		Seite
A.	1. Einleitung	1
	2. Allgemeine Vorbemerkungen zum Vorgang der Replikation	2
	3. Allgemeine Vorbemerkungen zur Mitochondrien-DNA und ihrer möglichen Funktion	6
	4. Fragestellung dieser Arbeit	8
B.	Methoden	
	1.a. Isolierung von Zellkernen	10
	b. Isolierung von Zellkern-DNA	11
	c. Isolierung von Mitochondrien	14
	d. Isolierung von Mitochondrien-DNA	15
	e. Reinigung und Charakterisierung von DNA durch Gradienten zentrifugation	22
	2. Untersuchung der DNA-Polymerase-Reaktion	26
	a. Reinigung der mitochondrialen DNA-Polymerase	27
	b. Untersuchung der DNA-Synthese in-vivo	29
	c. Bestimmung der Verteilung der Radioaktivität in verschiedenen Zellkomponenten von embryonalem Gewebe und von Lebergewebe nach Vorbehandlung mit Pharmaka	30
C.	Ergebnisse und Diskussion	
	1. Charakterisierung der mitochondrialen DNA-Polymerase	31
	a. Versuche zum Herauslösen und Anreichern von DNA-Polymerase aus Mitochondrien	32
	b. Anreicherung der mitochondrialen DNA-Polymerase durch Chromatographie an Sepharose 6 B	36
	c. Versuche zur Stabilisierung der DNA-Polymerase	38

Seite

d. Aufbewahrung der Mitochondrien-Präparation über einen längeren Zeitraum 41

e. Einfrieren von Mitochondrien-Fraktionen vor der Ultra-Turrax-Behandlung 41

f. Einfluß von KCl auf die mitochondriale DNA-Polymerase 43

g. Einige Parameter der mitochondrialen DNA-Polymerase-Reaktion 46

α. pH-Abhängigkeit
β. Zeitabhängigkeit der Reaktion

h. Matrizen-Spezifität der mitochondrialen DNA-Polymerase 47

α. Vergleich Mitochondrien-DNA und Zellkern-DNA
β. DNA aus verschiedenen Organen der Ratte
γ. Einfluß von Fe-Ionen auf die Matrizen-Funktion der DNA
δ. Matrizen-Funktion von DNA aus verschiedenen Tierspezies

2. Untersuchungen zur embryotoxischen Wirkungsweise von Cyclophosphamid (Endoxan®) 68

a. Umwandlung von Endoxan im Organismus; "aktive Form" 70

b. Theorien über die cytostatische Wirkungsweise von Endoxan 73

c. Eigene Untersuchungen mit Endoxan 79

α. Übergang von Endoxan und Endoxan-Metaboliten vom Muttertier auf den Embryo bzw. Feten
β. Alkylierungsrate von Kern - bzw. Mitochondrien-DNA (Untersuchungen mit ^{3}H-Endoxan)
γ. "Vernetzung" von DNA- und Proteinkomonenten
δ. Aktivität der mitochondrialen DNA-Polymerase nach Einwirkung von Endoxan
ε. Modifizierung der embryotoxischen Wirkung von Endoxan durch Beeinflussung der Endoxan-Umwandlung in-vivo

Seite

D. Zusammenfassung und Schlußfolgerungen 116

E. Literaturverzeichnis 121

A. 1. EINLEITUNG

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit einigen speziellen Problemen des DNA-Stoffwechsels.

Nachdem mehrere Jahrzehnte angenommen wurde, daß bei Eukarionten die genetische Information ausschließlich im Zellkern lokalisiert ist und darum auch als selbstverständlich unterstellt wurde, daß sich Vorgänge wie DNA-Replikation und die Transkription nur im Zellkern abspielen können, haben Untersuchungen der letzten Jahre gezeigt, daß eine solche Vorstellung modifiziert werden muß. Ein besonderer Typ von DNA wurde nämlich auch im Cytoplasma der Zelle - in Mitochondrien und in Chloroplasten - nachgewiesen. Auch diese cytoplasmatische DNA wird repliziert, und sie kann - ähnlich wie Zellkern-DNA - als Matrize zur Bildung bestimmter RNA-Formen dienen. Die Vorgänge der DNA-Verdoppelung und der DNA-abhängigen RNA-Synthese spielen sich daher bei Eukarionten sowohl im Zellkern als auch im Cytoplasma ab. Die Vorgänge im Zellkern und im Hyaloplasma weisen jedoch - trotz prinzipieller Ähnlichkeit - deutliche Unterschiede auf.

Über die Bedeutung der Replikationsvorgänge und der Transkription in cytoplasmatischen Zell-Organellen unter normalen Bedingungen und ganz besonders unter pathologischen Voraussetzungen sowie unter dem Einfluß von Pharmaka ist heute noch sehr wenig bekannt. Erste Hinweise lassen jedoch vermuten, daß die entsprechenden Vorgänge im Zellkern beziehungsweise in den Mitochondrien von Säugetierzellen zum Beispiel durch Pharmaka in verschiedener Weise beeinflußt werden. Damit gewinnt die cytoplasmatische Nucleinsäure-Synthese an Interesse bei der Analyse der Wirkungsweise von Pharmaka, die in den Nucleinsäure-Stoffwechsel eingreifen.

Im Rahmen dieser Arbeit wird über Ergebnisse berichtet, die in den letzten vier Jahren in unserer Arbeitsgruppe erhalten wurden. Diskutiert werden sollen:

1. Untersuchungen zur Isolierung und Charakterisierung von Mitochondrien-DNA

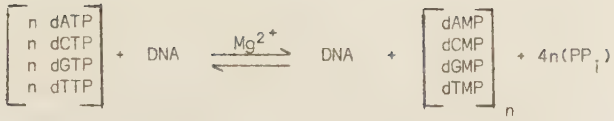
2. Untersuchungen über die Isolierung und Charakterisierung mitochondrialer DNA-Polymerase und

3. Vergleichende Untersuchungen, die an Zellkernen und Mitochondrien, die mit dem alkylierenden Cytostaticum Cyclophosphamid (Endoxan) behandelt wurden, durchgeführt wurden.

2. Allgemeine Vorbemerkungen zum Vorgang der Replikation

Bei der Mitose werden zwei identische Kopien der genetischen Information der Mutterzelle auf die beiden Tochterzellen übertragen. Der Mitose muß daher bei Eukarionten in jedem Falle eine DNA-Verdoppelung vorausgehen. Diese Replikation, das heißt, bei diploiden Zellen die Überführung in den tetraploiden Zustand,erfolgt in der S-Phase des Zellzyklus. Der hierzu benötigte Enzym-Apparat wird als "Replikase"bezeichnet.

Nach den grundlegenden Untersuchungen von KORNBERG und seiner Gruppe (6,46,47) schien das Ferment DNA-Polymerase (Deoxynucleosidtriphosphat: DNA-deoxynucleotidyltransferase, EC 2.7.7.7.) die Replikation zu bewerkstelligen. KORNBERG konnte dieses Ferment aus E. Coli isolieren und seine Eigenschaften untersuchen. Eine derartige Polymerase "polymerisiert" nach dem Vorbild einer vorhandenen DNA-Matrize Deoxynucleosidtriphosphate zum Makromolekül DNA nach dem Schema



Ein entsprechendes Ferment wurde einige Jahre später auch in Säugetierzellen nachgewiesen. DNA-Polymerasen aus Säugetiergeweben wurden besonders von BOLLUM und seiner Gruppe charakterisiert (7, 41).

Als Substrate von DNA-Polymerasen können nur die Deoxynucleosid-Triphosphate dienen. Zum Ablauf einer Synthese müssen alle vier in der DNA zu erwartenden Nucleotide gleichzeitig vorliegen. Die Reaktion ist streng Mg^{2+} abhängig. Ersetzt man im Versuchsansatz Mg^{2+} durch Mn^{2+}, so geht die Spezifität für Deoxyribonucleotide verloren, und es können - mindestens in-vitro - auch Ribonucleotide eingebaut werden. Diese Möglichkeit besitzt eine gewisse Bedeutung bei der Analyse neugebildeter DNA, da das gebildete DNA-Molekül an diesen Stellen RNase empfindlich ist.

Die DNA-Polymerase-Reaktion ist bis zu einem gewissen Grade umkehrbar. Bei Zusatz von Pyrophosphat in hoher Konzentration können die Triphosphate zurückgebildet werden (Pyrophosphorilyse).

Nach dem anfänglichen Optimismus tauchten jedoch nach einiger Zeit Zweifel auf, ob die DNA-Polymerase ("KORNBERG-Ferment") tatsächlich die gesuchte "Replikase" darstellt. Von vielen Untersuchern wird dem KORNBERG-Ferment heute lediglich die Funktion einer "repair-enzymes" zugesprochen. Diese Fähigkeit besitzt die KORNBERG-Polymerase zweifellos, das heißt, sie ist in der Lage, auch größere Defekte an einem der beiden Doppelstränge nach dem Spiegelbild des noch vorhandenen DNA-Stranges zu "reparieren". Ein solcher Vorgang stellt jedoch noch kei-

ne Replikation einer DNA-Doppelhelix dar.

Die Reglikation eines DNA-Doppelstranges stellt aus mehreren Gründen einen recht komplizierten Vorgang dar. Einmal ist die DNA in Säugetier-Chromosomen sehr stark verknäuelt, so daß es schwer vorstellbar ist, daß ein DNA-Polymerase-Molekül über die ganze Länge eines DNA-Fadens entlanglaufen kann. Zum anderen liegt die genetische Information auf den beiden DNA-Doppelsträngen in entgegengesetzter Ableserichtung vor. Ein DNA-Polymerase-Molekül kann jedoch eine DNA nur in einer Richtung ablesen. Dies würde bedeuten, daß eine Replikation gleichzeitig von zwei Polymerasen durchgeführt werden müßte, die in zwei verschiedenen Ableserichtungen arbeiten. Für eine solche Vorstellung gibt es keinen experimentellen Anhaltspunkt. Vielmehr ist von allen heute bekannten Polymerasen nachgewiesen worden, daß sie in der Richtung 5' ——→ 3' arbeiten.

Zum Vorgang der Replikation muß die DNA-Doppelhelix an der Stelle der Ablesung über eine mehr oder minder große Spanne "geschmolzen" beziehungsweise "denaturiert" werden. Die DNA-Polymerase müßte dann den DNA-Doppelstrang erst in der einen Richtung und dann in der anderen Richtung entlanglaufen. Bei diesen Überlegungen wird klar, daß eine Replikation allein mit einer DNA-Polymerase schwer vorstellbar ist. Bei einer DNA-Synthese aus kleinen Bruchstücken muß die DNA-Polymerase mit weiteren Enzymen, zum Beispiel Nucleotidasen und Ligasen, eng zusammenarbeiten (7o. OKAZAKI).Die DNA-Polymerase könnte daher nach unseren heutigen Vorstellungen nur eineBestandteil eines größeren "Replikasekomplexes" darstellen.

Der Vorgang der DNA-Replikation ist damit ein sehr komplexes Geschehen, das in seinen Einzelheiten heute noch sehr unvollkommen verstanden wird.

Das Bild ist in der letzten Zeit durch Befunde, die an den am besten untersuchten Mikroorganismen (E.Coli) erhoben wurden, noch weiter kompliziert worden. So konnten Mutanten isoliert werden, bei denen eine Aktivität des KORNBERG-Enzyms kaum nachweisbar war, die jedoch weitgehend normal replizierten (22, 72). Dieser Befund konnte als Hinweis dafür gewertet werden, daß das KORNBERG-Enzym nicht mit der "Replikase" identisch ist - mindestens nicht in diesen Mikroorganismen. In ganz neuen Untersuchungen ist es weiterhin gelungen zu demonstrieren, daß Mutanten mit einer thermolabilen Replikase isoliert werden konnten, die bei erhöhter Temperatur keine DNA-Replikation zeigen - trotz normaler Aktivität des KORNBERG-Enzyms (89). Mindestens bei Mikroorganismen scheint damit das Vorhandensein einer DNA-Polymerase (Replikase) bewiesen zu sein, die mit dem KORNBERG-Enzym nicht identisch ist.

Es ist zur Zeit schwer zu entscheiden, ob ähnliche Verhältnisse auch bei der DNA-Replikation im Zellkern von Eukarionten vorliegen. Der Replikationsvorgang ist bei Säugetieren - aus naheliegenden Gründen - sehr viel unvollständiger untersucht, als dies bei Mikroorganismen der Fall ist. Die DNA-Polymerasen aus Säugetiergeweben sind darum auch nicht annähernd in einem Reinheitszustand isoliert, wie dies beim KORNBERG-Enzym gelungen ist. Das Vorhandensein mehrerer DNA-Polymerasen ist jedoch auch im Säugetiergewebe bewiesen. Eine brauchbare Analyse der Funktion dieser DNA-Polymerasen ist jedoch noch nicht gelungen.

Die Untersuchung von DNA-Polymerasen aus Säugetiergeweben wird durch einen weiteren Umstand wesentlich erschwert. Während der Isolierung ändert nämlich die DNA-Polymerase sehr leicht ihre Eigenschaften: Während das Enzym primär nur in Gegenwart aller vier Nucleosid-triphosphate aktiv ist, kommt es während der Isolierung

leicht zum Auftreten einer "terminalen Nucleosidyl-Transferase", die in der Lage ist, einen "Einbau" auch in Gegenwart nur eines Deoxynucleosid-triphosphats durchzuführen. Diese terminale Nucleosidyl-Transferase, die ein kleineres Molekulargewicht besitzt als die DNA-Polymerase und zum Beispiel mit Hilfe einer Sephadex-Säule abgeteilt werden kann, entsteht offenbar als ein "Artefact" während der Isolierungsprozedur aus dem DNA-Polymerase-Komplex. Aus den Daten in der Literatur kann abgeleitet werden, daß eine Reihe von Untersuchern, die sich um eine Isolierung reiner DNA-Polymerasen aus Säugetiergeweben bemüht haben, im Endeffekt vorwiegend eine terminale Nucleosidyl-Transferase in Händen hatten.

Obgleich die eigentliche Funktion einer DNA-Polymerase in Säugetiergeweben zur Zeit noch nicht endgültig überschaubar ist, erscheint es doch gerechtfertigt, Untersuchungen mit diesem Enzym anzustellen. Bei der Untersuchung der DNA-Polymerase-Aktivität in Säugetiergeweben mit verschiedener Wachstumsgeschwindigkeit ergibt sich fast ausnahmslos eine sehr gute Korrelation zwischen der Enzym-Aktivität und der Proliferationsrate. Diese Befunde sprechen dafür, daß DNA-Polymerasen in irgendeiner Weise mit der Replikation korreliert sind.

3. Allgemeine Vorbemerkungen zur Mitochondrien-DNA und ihrer möglichen Funktion

1964 wurde erstmals beschrieben, daß Mitochondrien - Zellorganellen, in denen zum Beispiel der entscheidende Anteil des oxydativen Energiestoffwechsels stattfindet - ebenfalls DNA enthalten (53,60). Nur ein Jahr später wurde von NEUBERT und Mitarbeitern an Säugetiergeweben (62,81) und WINTERSBERGER an Hefen (92) nahezu gleichzeitig gefunden, daß Mitochondrien auch eine eigene DNA-Polymerase besitzen. Wir haben uns dann überwiegend der mitochondrialen DNA-Replikation zugewandt, da dieses

Sytem gegenüber der DNA-Synthese in den Zellkernen einige wesentliche Vorteile besitzt. (5, 9, 38, 61, 66, 73, 74, 75, 76, 77, 79, 80)

1. Die mitochondriale, zirkuläre DNA besitzt ein bekanntes, relativ niedriges Molekulargewicht von ungefähr 10^7. Das entspricht einer mittleren Länge von etwa 5 µm. Der Informationsgehalt ist daher vergleichsweise gering und damit besser überschaubar. Mit diesem geringen Informationsgehalt ist allerdings auch gleichzeitig eine gewisse Problematik verbunden, da bis heute nicht eindeutig geklärt werden konnte, welche Synthese von "Schlüssel"-Proteinen - maximal etwa 5 000 Aminosäuren - durch diese DNA codiert wird. Im allgemeinen enthält ein Mitochondrion zwei bis sechs DNA-Moleküle, die aber vermutlich identisch sind. Di- und gelegentlich auch Oligomere kommen ebenfalls vor; da sie aber in bestimmten Krebszellen und nach Mangelernährung verhältnismäßig stark zunehmen, handelt es sich wahrscheinlich um pathologische Erscheinungsformen. Ein weiterer, ganz wesentlicher Unterschied zur Zellkern-DNA liegt darin, daß die Mitochondrien-DNA proteinfrei vorliegt; sie ist "nackt". Trotzdem scheint eine Steuerung von Transkriptionsvorgängen - zum Beispiel durch Schilddrüsenhormon - möglich zu sein (17, 37, 69)
2. Mitochondriale DNA hat in Lebergeweben erwachsener Tiere die kurze Halbwertzeit von ca. 7 Tagen. In schneller wachsenden Geweben - zum Beispiel Organen junger Tiere oder in Tumoren - ist der Umsatz mitochondrialer DNA jedoch offenbar herabgesetzt. Zellkern-DNA hat wie seit langem bekannt keinen "Umsatz". Die DNA verschwindet nur beim Absterben der Zellen.

4. Fragestellung dieser Arbeit

Wir haben in unsere Untersuchungen embryonales Gewebe einbezogen, da wir am Stoffwechsel embryonalen Säugetiergewebes und seiner Beeinflußbarkeit durch Pharmaka besonders interessiert sind. Embryonales Gewebe ist durch eine ganz besonders hohe Proliferationsgeschwindigkeit ausgezeichnet. Im Rattenembryo versiebenfacht sich die Zellzahl innerhalb von 24 Stunden von Tag 11 zu Tag 12 der Schwangerschaft. Gleichzeitig findet eine große Zahl von Differenzierungsvorgängen statt, im Gegensatz zu zum Beispiel Tumorgeweben in denen Entdifferenzierungen auftreten.

1. Isolierung und Charakterisierung mitochondrialer DNA-Polymerase

Da der Nucleinsäurestoffwechsel in Mitochondrien offenbar in vieler Hinsicht einen von der Steuerung des Zellkerns weitgehend unabhängigen Ablauf zeigt, ist es interessant spezielle Probleme dieser Stoffwechselvorgänge wie zum Beispiel die Matrizen-Spezifität der DNA-Polymerase, Fragen der Regulation und andere Fragen zu untersuchen. Man hat hier den Vorteil, die spezielle Fragestellung von Funktionsunterschieden in zwei verschiedenen Systemen - Zellkern und Mitochondrien - im gleichen Organismus untersuchen zu können. So ist es zum Beispiel interessant im Kreuzversuch zu testen, ob nur die Mitochondrien-DNA als Matrize von mitochondrialer Polymerase akzeptiert wird, oder ob auch "unphysiologische" Zellkern-DNA bis zu einem gewissen Grade aktiv ist. Solche Experimente können uns einen Einblick geben in die Spezifität von Polymerase-Reaktionen, die nach neuesten Erkenntnissen auch auf der Ebene der Enzym-Moleküle reguliert werden können.

Diese Untersuchungen werden allerdings dadurch erschwert, daß die mitochondriale DNA in den Mitochondrien nur in einer Konzentration von ca. 1 µg/mg Mitochondrien-Protein vorliegt. Da die Isolierungsmethoden verlustreich und das Makromolekül der DNA - besonders in seiner Faltungs-Struktur - labil ist, mußte ein beträchtlicher Teil der in dieser Dissertation niedergelegten Arbeit darauf verwandt werden, Verfahren zu entwickeln, die bei größtmöglicher Schonung des Moleküls mehrere hundert Mikrogramm DNA liefern können.

2. Untersuchungen zur embryotoxischen Wirkungsweise von Endoxan

Ein weiterer Schwerpunkt dieser Arbeit liegt in der Untersuchung des Einflusses des alkylierenden Pharmakons Cyclophosphamid (Endoxan ^{R}) auf den DNA-Stoffwechsel. Endoxan ist in-vitro unwirksam und muß erst von mikrosomalen "mixed-function oxidases" der Leber - vermutlich oxidative Ringspaltung - "aktiviert" werden. Da Endoxan die Zellvermehrung hemmt und andererseits die Bildung kovalenter Bindungen mit Basen der DNA nachgewiesen ist, wird allgemein akzeptiert, daß Endoxan seine Wirkung durch Angriff an der DNA-Struktur entfaltet. Endoxan besitzt auch starke embryotoxische Wirkungen. Diesen Effekt ruft Endoxan bereits in Dosen hervor, die mindestens eine Zehnerpotenz unter denen liegen, die zur Erzeugung eines toxischen (letalen) Effektes beim erwachsenen Tier notwendig sind. In diesem Zusammenhang sind jedoch in letzter Zeit Zweifel aufgetaucht, ob zu mindestens diese embryotoxischen Wirkungen ausschließlich auf Veränderungen im DNA-Stoffwechsel durch Alkylierungen zurückgeführt werden können. Neben den allgemeinen biochemischen Untersuchungen soll in dieser Arbeit versucht werden, einen Beitrag zur Lösung dieser pharmakologischen Probleme zu leisten.

B. METHODE:

1 a. Isolierung von Zellkernen

Zur Isolierung von Zellkernen wird das Gewebe zunächst im Potter-Elvehjem-Homogenisator (60 ml Glaszylinder mit Teflonpistill) in schwach hypertoner Saccharoselösung (0,32 M Saccharose + 3 mM Mg^{2+} + 10 mM Tris, pH 7,5) homogenisiert. Zellkerne, intakte Zellen und Erythrocyten werden beim Zentrifugieren (10 Min.) bei 700 x g (MSE Mistral 4L, Rotor 12 x 100 bei 1500 U/Min.) sedimentiert. Der Überstand wird verworfen und die "rohen" Zellkerne werden dann noch zweimal in der gleichen Saccharoselösung resuspendiert und erneut abzentrifugiert ("gewaschen"). Diese zweimal gewaschenen"Rohkerne" sind in den meisten Fällen rein genug für die Isolierung von Zellkern-DNA. Wird jedoch in bestimmten Fällen ein höherer Reinheitsgrad verlangt, so werden die Kerne nach dem Verfahren von TATA und WIDNELL (91) in der Modifikation von BASS (4) weiterbehandelt: Dazu werden die Kerne in 0,32 M Saccharose aufgenommen. 1 ml Kernsuspension wird mit 9,3 ml 2,4 M Saccharose versetzt, sodaß eine Endkonzentration von 2,2 M resultiert. Die 0,32 M Saccharose enthält außerdem 3 mM Mg^{2+}, die 2,4 M Saccharose enthält 1 mM Mg^{2+}. Dieses wird 1 Stunde bei 27 500 U/Min. = 50 000 x g in der Spinco-Ultrazentrifuge im Rotor 40 zentrifugiert. Unter diesen Bedingungen sedimentieren nur die Zellkerne, während Verunreinigungen wie Mitochondrien, Mikrosomen, intakte Zellen, Erythrocyten u.s.w. an die Oberfläche flotieren. Die angegebenen Saccharosekonzentrationen gelten exakt nur für die Zellkerne aus Lebergewebe, und sie können für andere Gewebe abweichen und müssen in jedem Fall neu ausprobiert werden. Da diese Reinigungsmethode aber verlustreich ist, wird sie nur dann angewandt, wenn zum Beispiel eine weitgehende Abtrennung von Mitochondrien verlangt wird. Die Kontrolle der Reinheit erfolgt dann im Phasenkontrastmikroskop oder im Elektronenmikroskop.

1 b. Isolierung von Zellkern-DNA

Das Zellkernsediment wird in 0,15 M NaCl + 0,015 M EDTA-Lösung, pH 8,0 aufgenommen. EDTA soll dabei die Mg^{2+}-abhängigen DNasen, die im Zellkern anwesend sein können und die DNA partiell spalten würden, hemmen. Die weitere Isolierung der DNA erfolgt nach einer von uns modifizierten Kombination der Verfahren von KIRBY (42) und MARMUR (55). Die Methode von MARMUR wurde ursprünglich zur Isolierung von bakterieller DNA entwickelt. Der Zellkernsuspension werden 10% des Volumens 20%ige Natriumdodecylsulfatlösung (SDS), pH 8,0, zugefügt, um die Zellkernmembran zu lysieren und abbauende Enzyme zu hemmen. Durch diesen Vorgang der Lysis wird die Zellkern-Fraktion durch die austretende DNA in eine gallertige durchsichtige Suspension verwandelt. Diese Lösung wird mit dem gleichen Volumen eines Phenol-Kresolgemisches (1000 g Phenol + 140 ml frisch destilliertes m-Kresol + 290 ml H_2O + 1 g 8-Hydroxy-chinolin) versetzt. Das Phenol soll die Proteine des Zellkerns denaturieren und gleichzeitig lösen. Die Emulsion wird ca 1 Stunde geschüttelt, und die beiden Phasen werden anschließend durch Zentrifugation in einer gekühlten Laborzentrifuge Junior I KS der Firma Christ/Osterode getrennt. Die phenolische Phase wird verworfen, und die wässrige Phase mit dem gleichen Volumen eines Gemisches $CHCl_3$ + Isoamylalkohol (25 : 1) versetzt. Die Emulsion wird 30 Min. geschüttelt, und die Phasen werden erneut durch Zentrifugation getrennt. Chloroform denaturiert ebenfalls Proteine, vermag sie jedoch nicht zu lösen. Es bildet sich daher eine gallertige Zwischenschicht zwischen den beiden flüssigen Phasen. Nach dem Entfernen der Zwischenschicht und der $CHCl_3$-Phase wird die wässrige Phase mit dem doppelten Volumen Äthanol überschichtet, und durch Umrühren mit einem Glasstab wird die DNA als eine fädige Masse gefällt. Sie bleibt am Glasstab haften und kann so leicht aus der Lösung entfernt werden. Sie

wird anschließend in 0,15 M NaCl + 0,015 M Trinatriumcitrat-Lösung, pH 7,0 gelöst. Alle Operationen wie Pipettieren, Lösen usw. müssen mit großer Vorsicht ausgeführt werden, um zu vermeiden, daß Scherkräfte ("shearing forces") auftreten, die die Fadenmoleküle zerreißen würden. Die DNA-Lösung wird dann 30 Min. mit 50µg/ml RNase und 50µg α-Amylase bei 37° inkubiert, um RNA und Glykogen, die durch die Behandlung mit Phenol und $CHCl_3$ nicht extrahiert werden, zu entfernen. Bevor die RNase der Inkubationslösung zugesetzt wird, wird sie nach Lösen in 0,1 M Tris-Puffer, pH 7,5 10 Min. bei 75° vorinkubiert, um die evtl. gleichzeitig vorhandene, aber hitzelabile DNase zu zerstören. Anschließend wird noch weitere 30 Min. mit je ca. 0,5 mg Trypsin und Chymotrypsin inkubiert, um Proteine, die direkt an der DNA anhaften, ebenfalls zu spalten. Die Enzymproteine werden dann durch mehrfache Extraktion mit $CHCl_3$ entfernt. Die Behandlung ist beendet, wenn zwischen den beiden flüssigen Phasen praktisch keine Zwischenschicht mehr gebildet wird. Die DNA wird dann erneut mit dem doppelten Volumen Alkohol gefällt. Nach dem Lösen in SSC werden zur Erhöung der Ionenstärke 10% des Volumens einer 3,0 M Natriumacetatlösung + 0,001 M EDTA, pH 7,0 hinzugefügt. Aus dieser Lösung wird die DNA mit 60% des Volumens mit Isopropanol gefällt. Diese Fällung ist relativ spezifisch für DNA und läßt RNA, deren Bruchstücke sowie nicht zu hochmolekulare Polysaccharide in Lösung. Diese Fällungsmethode läßt sich aber nicht generell auf die Fällungen von DNA während der übrigen Isolierungsprozedur anwenden, da sie auch für die DNA sehr verlustreich ist. Die DNA-Ausbeuten betragen 40 - 50% bezogen auf die DNA-Menge in den "Rohkernen". In SSC oder Tris-Puffer gelöst ist die DNA nach Zusatz eines Tropfen Chloroform 2 - 4 Wochen unverändert bei 4° haltbar.

Ein gutes Kriterium für die Reinheit der DNA ist der sog. Schmelzpunkt (T_m). Man versteht darunter die Temperatur, bei der die beiden Stränge der WATSON-CRICK-Spirale (87, 88) die durch Wasserstoffbrücken zusammengehalten werden, sich voneinander lösen. Die Auflösung der Doppelhelix-Struktur macht sich durch einen Anstieg in der Adsorption bei 260 mμ bemerkbar, da dann die Hypochromicität des nativen DNA-Moleküls zu einem Teil aufgehoben wird. Der T_m ist ein Charakteristikum für jede DNA und abhängig von ihrer Zusammensetzung, da sich die Guanin-Cytosin (G-C)-Wasserstoffbrücken nicht so leicht lösen wie die Adenin-Thymin (A-T)-Wasserstoffbrücken. Dieser T_m liegt für Warmblüter-DNA bei 89 - 90°. Ist die DNA verunreinigt, so sinkt der T_m ab. (23, 54)

Einfacher als die Bestimmung von T_m ist die Aufnahme des Adsorbtionsspektrums der DNA im Bereich von 220 - 300 mμ. In den meisten Fällen genügt es sogar, nur drei Punkte des Spektrums bei 235, 260 und 280 mμ zu messen und die Quotienten 260/235 und 260/280 zu bilden. Bei 235 mμ erfaßt man die Peptidbindungen von evtl. vorhandenen Proteinen und bei 280 mμ die aromatischen Aminosäuren. Dieser Quotient sollte mindestens bei 1,6, möglichst aber bei 2,0 liegen oder besser sein. Gleichzeitig läßt sich damit eine ungefähre Mengenangabe machen, da eine Extinktion von 1,0 = 40 µg DNA entspricht.

Die gebräuchlichste Methode zur quantitativen Bestimmung von DNA ist die kolorimetrische Methode von BURTON (16). Sie beruht auf der Reaktion von Diphenylamin mit der Desoxyribose der DNA, die zur Bildung eines violetten Farbstoffes führt. Die Probe, die zuvor bei 75° 15 Min. mit 5%iger $HClO_4$ hydrolysiert worden ist, wird mit einer Reagenzlösung von 1,5 g Diphenylamin und 1,5 ml konzentrierte H_2SO_4 in 100 ml Eisessig versetzt und ca. 18 Stunden bei Raumtemperatur stehengelassen. Die Reagenzlösung enthält außerdem noch wenige Tropfen einer ver-

dünnten Acetaldehydlösung, da rein empirisch gefunden wurde, daß die Eichkurve im Bereich von 5 - 50 µg DNA/ Probe nur in Gegenwart von Acetaldehyd streng linear ist. Über den Ablauf der Reaktion, die Rolle des Acetaldehyd in dieser Reaktion und die Struktur des Farbstoffes ist jedoch bisher wenig bekannt. Die Messung der Extinktion erfolgt bei 565, 595 und 625 mµ; nach Verdoppelung der Werte bei 595 mµ werden die Werte bei 565 und 625 mµ subtrahiert. Die Berechnung erfolgt dann an Hand einer Eichkurve. Die Methode besitzt den Vorteil, relativ störunanfällig zu sein, so daß auch Messungen in Gegenwart von RNA oder Proteinen möglich sind. Ihr Nachteil liegt in ihrer relativen Unempfindlichkeit, so daß man bei Messungen im Mikrobereich (<5 µg) doch auf die ungenauere Messung im Ultravioletten angewiesen ist.

1 c. Isolierung von Mitochondrien

Die Isolierung von Mitochondrien wird wie die Isolierung von Zellkernen in schwach hypertoner Saccharoselösung vorgenommen; statt Mg^{2+} enthält das Homogenisationsmedium jedoch 0,5 mM EDTA. Der EDTA-Zusatz soll DNase hemmen. Ein Zusatz von EDTA würde bei der Kernisolierung eine Schädigung der Kernmembran verursachen, so daß für eine Kern- und eine Mitochondrienisolierung verschiedene optimale Bedingungen vorliegen müssen. Ist die Einwirkung von EDTA auf die Kernmembran jedoch nur kurzfristig, so kann man das Homogenisieren des Gewebes und die erste Zentrifugation (siehe S.10) in EDTA-Saccharose-Lösung ausführen ohne die Kerne allzusehr zu schädigen. Die Verklumpung von Mitochondrien durch Mg^{2+} ist jedoch irreversibel. Nach dem Abzentrifugieren der Zellfraktion wird der Überstand bei 12 000 U/Min. = 12 000 x g im Rotor 6 x 100 der MSE-High Speed-Zentrifuge erneut 10 Min. zentrifugiert. Der Überstand, der noch die mikrosomale Fraktion und die löslichen Enzyme enthält,

wird verworfen und das Mitochondriensediment wird noch zweimal in EDTA-Saccharose-Lösung suspensiert und bei 11 000 U/Min. abzentrifugiert. Das Sediment wird dann mit soviel 2,4 M EDTA-Saccharose-Lösung aufgenommen, so daß die Endkonzentration 1,7 M beträgt. Die Suspension wird in ein Zentrifugenröhrchen gefüllt und mit 0,32 M Saccharoselösung vorsichtig überschichtet. Die Konzentration ist so gewählt, daß die Mitochondrien bei 24 000 U/Min. = 58 600 x g im SW 25- oder SW 27-Rotor von Spinco-Beckmann entgegen der Schwerkraft flotieren, während die schwereren Partikel (Zellkern-Bruchstücke) sedimentieren.

1 d. Isolierung von Mitochondrien-DNA

Die Mitochondrienschicht wird abgetrennt und in ähnlicher Weise wie die Kerne mit NaCl-EDTA-Lösung verdünnt, mit SDS lysiert und mit Phenol und $CHCl_3$ extrahiert. Alle diese Operationen müssen im Falle der Mitochondrien möglichst rasch durchgeführt werden - so wird zum Beispiel das SDS zur Erzielung einer schnelleren Lysis auf ca. 50° angewärmt - , da bei einer zu großen Zeitdifferenz zwischen dem Aufbrechen der Partikel und der Hemmung durch SDS und Phenol endogene Nucleasen wirksam werden und die DNA-Strukturen zerstören können. Endogene Nucleasen spielen in den Mitochondrien eine so große Rolle, daß es zum Beispiel bei Säugetier-Mitochondrien noch nicht gelungen ist, intakte RNA zu isolieren. Zusätzlich tritt ein weiteres Problem auf, das darin besteht, daß die quantitative Relation DNA : Protein ungefähr 1 : 1000 ist, das heißt die Mitochondrien enthalten nur ca 1µg DNA/mg Protein. Die DNA-Menge schwankt etwas in Abhängigkeit vom Gewebe und von der Tierspezies. Während Leber-Mitochondrien eher weniger DNA enthalten, liegt der DNA-Gehalt in embryonalem und in Tumorgewebe zum Teil bedeutend höher (bis 5µg DNA/mg Protein). Eine bemerkenswerte Ausnahme bilden die Oozyten von Lurchen, die prall gefüllt sind

mit zirkulärer DNA. Diese besondere DNA ist von DAWID und WOLSTENHOLME (19-21,93) ausführlich untersucht worden.

Nach den Proteinextraktionen wird die durch Flavone gelb gefärbte Lösung mit dem 3 - 3,5-fachen Volumen Äthanol versetzt, um die DNA zu fällen. Der größere Äthanolüberschuß wurde gewählt, um so wenig wie möglich DNA zu verlieren. Dabei wird bewußt in Kauf genommen, daß verhältnismäßig viel Proteine und Salze mitgefällt werden, die ihrerseits DNA adsorbieren und mitreißen können. Zur Vervollständigung des Niederschlages wird die Suspension mindestens 12 Stunden bei -2o° gehalten. Anschließend wird das Sediment abzentrifugiert und in SSC aufgenommen. Die enzymatische Behandlung wird dann wie bei der Kern-DNA beschrieben durchgeführt nur mit der Ausnahme, daß an Stelle von Trypsin und Chymotrypsin die unspezifische Bakterienprotease Nagarse (Firma Serva, Wiesloch) verwandt wird. Die Entfernung der Enzymproteine erfolgt dann wiederum durch $CHCl_3$-Extraktion. Die verbleibende Lösung wird dann in Kollodiumhülsen (Firma Sartorius, Göttingen) eingeengt, wobei durch schrittweise Zugabe von 0,1 M Tris-HCl-Puffer, pH 7,5, die ursprünglich relativ hohe Salzkonzentration allmählich verringert wird. Zur Abtrennung von kleinmolekularen Bestandteilen wird die auf ca 1 ml eingeengte Lösung in einer Sepharose 2B-Säule (Firma Pharmacia, Frankfurt/Main) fraktioniert. In Sepharose 2B werden Moleküle bis zu einem Molekulargewicht von 25×10^6 fraktioniert, so daß die Mitochondrien-DNA (MG = 10^6) sogar von DNA anderer Herkunft, das heißt von anderm Molekulargewicht abgetrennt werden kann. Die Chromatographie erfolgt in einer Säule von 2,5 cm Ø und 30 cm Höhe aufsteigend mit einer Schlauchpumpe und einem Fraktionssammler der Firma LKB, Stockholm. Die optische Registrierung erfolgt in Extinktionseinheiten in

Abbildung 1 :

Reinigung von Mitochondrien-DNA an Sepharose 2 B

Die Trennung erfolgte aufsteigend an einer Säule von 2,5 cm Ø und 3o cm Länge; Ausschlußgrenze von Sepharose 2 B: $\bar{M}$ = 4o x $1o^6$. Die Messung der Extinktion erfolgte in einer Durchflußküvette mit 1 cm Schichtdicke.

Eine angedeutete Trennung in 3 Komponenten - entsprechend der verschiedenen Molekularformen - ist erkennbar. Zellkern-DNA müßte an der Startlinie laufen (nicht nachweisbar).

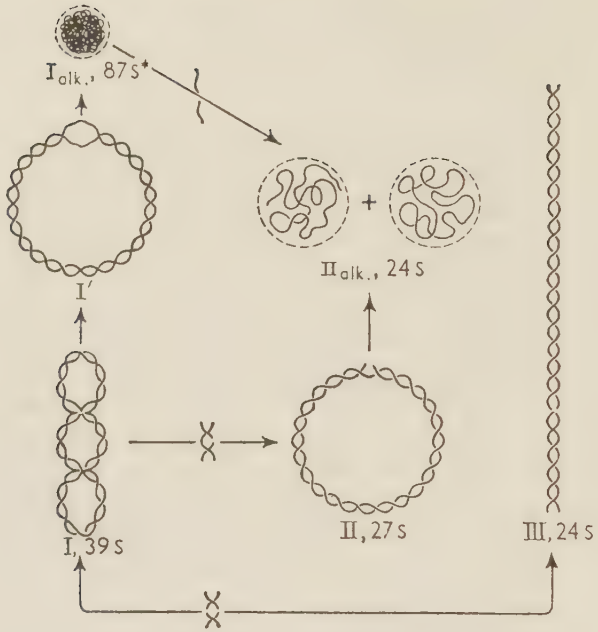


Abbildung 2 :

Schematische Darstellung der verschiedenen Formen von Mitochondrien-DNA nach VINOGRAD (85) in einer modifizierten Darstellung von DAWID (21).

Die normalerweise vorliegende Form I (39s)wandelte sich durch Bruch eines Stranges der Doppelhelix in die Form II (27s, "open ring") um. Bruch zweier Stränge führt zur linearen Form III (24s).

In Alkali (pH 13 - 14) wandelt sich I über I' in die "supercoiled"-Form I_{alk} (87s) um, die sich nach Bruch einer Kette in die beiden Einzelstränge auftrennen, d.h. denaturieren läßt. Nimmt man die Denaturierung im alkalischen CsCl-Gradienten vor, lassen sich die beiden Stränge isolieren, was sonst nicht möglich ist, da Mitochondrien-DNA spontan renaturiert.

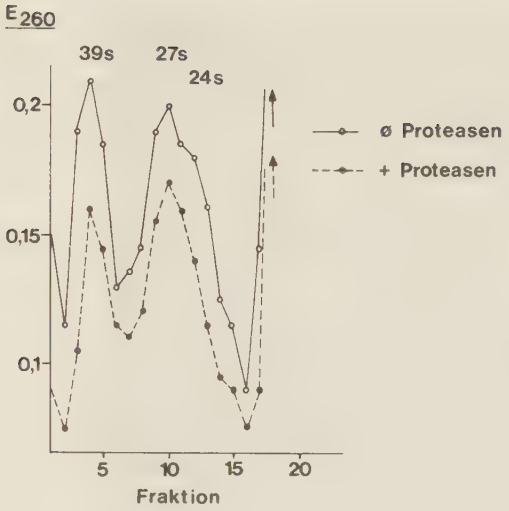


Abbildung 3 :

Trennung von Mitochondrien-DNA aus Rattenleber im Saccharose-Gradienten.

(Saccharose-Gradient: 7 → 25 %, 195 Min. bei 64.000 U/Min. im Rotor SW 65)

Die Trennung erfolgt in 39s-("highly twisted")- und 27s-("open ring")-Form der DNA (vergl. Abb. 2). Ohne Behandlung der DNA-Präparation mit der Protease (Nagarse) wird am 27s-Peak noch eine Schulter (24s) gefunden. Diese offenkettige Form der DNA entsteht offenbar durch Spaltung der DNA durch endogene DNasen.

Abbildung 4 :

Zwei NASS-Filamente (↙) in einem Mitochondrium aus der menschlichen Uterusschleimhaut.
x = Hohlräume des rauhen endoplasmatischen Reticulums.
Vergrößerung: 1 : 84.000

Abbildung 5 :

Isolierte Mitochondrien-DNA aus der Rattenleber.
Die ringförmige DNA ist entweder offen (I) oder "highly twisted" (II)
Vergrößerung: 1 : 63.000

einer 0,5 cm Durchflußküvette eines Doppelstrahl-Durchflußphotometers des Firma ISCO (Firma Biocal, München) bei 254 mμ. Die Säule ist mit 0,1 M Tris-HCl-Puffer, pH 7,5 äquilibriert (Abb. 1). Nach der Fraktionierung werden die DNA-enthaltenden Fraktionen - insgesamt 6 - 8 ml - vereinigt und erneut in Kollodiumhülsen eingeengt. Alle benutzten Glasgefäße wurden zur Vermeidung von Adsorption der DNA vor Gebrauch silikonisiert.

Aus 50 Rattenlebern werden so 300 - 400 µg Mitochondrien-DNA gewonnen. Bei der quantitativen Bestimmung wird man sich in der Regel auf die Messung der DNA bei 260 mμ beschränken, um keine Substanz bei der BURTON-Reaktion zu verlieren. Die DNA kann direkt als Matrize in der Polymerase-Reaktion eingesetzt werden. In einem weiteren Fraktionierungsschritt, der allerdings überwiegend analytischen Wert besitzt, läßt sich die DNA in drei Komponenten unterteilen. Nach dem Schema von VINOGRAD (85), das ursprünglich für Polyoma-Virus-DNA entwickelt wurde und allgemein Gültigkeit für zirkuläre doppelsträngige DNA besitzt, findet man bei einem pH von 7 - 8 eine starkeverknäulte Form ("highly twisted") mit einer Sedimentationskonstanten von 39s, einem offenen Ring ("open ring") von 27s und eine lineare Form von 24s. Die angegebenen s-Werte können in Abhängigkeit vom pH und der Ionenstärke bei verschiedenen Autoren um 1 - 2 s nach oben oder unten abweichen. (Abb.2 , Abb.3)
Da elektronenmikroskopische Aufnahmen von Mitochondrienschnitten die DNA als sehr kompakte Strukturen zeigt ("NASS-Filamente"), ist anzunehmen, daß die 39s-Form die ursprüngliche Struktur ist. (Abb.4,5)
Die 27s-Form kann man sich als Produkt der Reaktion mit DNase I, die nur einen Strang der DNA angreift, vorstellen, während entsprechend die 24s-Form durch Reaktion mit DNase II, die gleichzeitig 2 Stränge aufbricht, zustande gekommen sein könnte. Es läßt sich jedoch zur Zeit nicht

entscheiden, ob im intakten Mitochondrion nur die 39s-Form vorkommt, da die codierende Form der Mitochondrien-DNA und der Ablesemechanismus noch nicht bekannt sind, zumal auch bei größter Vorsicht bei der Isolierung niemals mehr als 50% "highly twisted"-Form gefunden werden können. (8)

1 e. Reinigung und Charakterisierung von DNA durch Gradientenzentrifugation

Die Auftrennung der verschiedenen Komponenten erfolgt am einfachsten im Saccharosegradienten. Diese Technik wurde 1953 von BRAKKE (11,12) und SINCLAIR (96) zur Trennung von Makromolekülen entwickelt. Zur Herstellung eines solchen Gradienten mischt man zu einer kontinuierlich ausfließenden konzentrierten Saccharoselösung eine weniger konzentrierte, so daß sich nach beendeter Gradientenbildung am Boden des Röhrchens die konzentrierte und an der Oberfläche die verdünnte Lösung befindet. Dieser lineare Saccharosegradient wird vorsichtig mit der aufzutrennenden gelösten Substanz überschichtet und eine bestimmte empirisch ermittelte Zeit im Schwingrotor einer präparativen Ultrazentrifuge zentrifugiert. (Abb. 5) (Abb. 6) Je höher die erreichte g-Zahl ist, um so kürzer ist die Trenndauer; wir benutzten deshalb überwiegend den Rotor SW 65 (Firma Beckman-Spinco, g_{max} = 420 000), der die Zentrifugationsdauer auf 195 Min. verkürzte. Der Nachteil dieses Hochleistungsrotors liegt in seiner geringen Kapazität, so daß in jedem der drei 5 ml-Röhrchen nur jeweils maximal 5 µg von jeder Komponente getrennt werden konnten. Das Prinzip dieser Trennungsmethode besteht darin, die maximale Saccharosekonzentration etwas geringer zu wählen als der Dichte der aufzutrennenden Substanz entspricht. Bei genügend langer Zentrifugation würden daher alle Partikel am Boden des Röhrchens sedimentieren. Unterbricht man die Zentrifugation rechtzeitig, so bilden die verschiedenen Komponenten in Ab-

hängigkeit von ihren Sedimentationskoeffizienten Banden, die nach dem Punktieren des Röhrchens mit einer Kanüle fraktioniert aufgefangen werden können.(83)

Eine andere Möglichkeit der Auftrennung der einzelnen Komponenten ist die Dichtegradienten-Zentrifugation im CsCl-Gradienten. Bei dieser Form der Gradientenzentrifugation wird die Substanz mit einer CsCl-Lösung genau bekannter Konzentration, die am einfachsten über den Refraktionsindex bestimmt wird, gemischt. Der Dichtegradient bildet sich dabei erst während der Zentrifugation aus, da sich unter dem Einfluß des Schwerefeldes die hydratisierten Cs-Ionen am Boden des Röhrchens anreichern. Man bezeichnet diesen Gradienten daher als isopyknischen Gradienten. Diese Technik wurde hauptsächlich von VINOGRAD (56,57,84) entwickelt und untersucht. Im Falle der Mitochondrien-DNA muß man allerdings einen Kunstgriff anwenden, um die Partikel, die trotz verschiedener s-Zahl die gleiche Dichte aufweisen, zu trennen. Dieser Kunstgriff beruht auf der Reaktion der DNA mit dem Farbstoff Ethidiumbromid. Dieser Farbstoff kann sich aufgrund seiner Struktur - es handelt sich um dreiringiges System vom Anthracentyp - zwischen die Basenpaare der DNA schieben (= Intercalation). Dadurch wird die Doppelhelix der DNA aufgeweitet und die Dichte verringert sich. Da jedoch das 39s-Partikel durch seine stark geknäuelte Struktur bei dieser Reaktion sterisch behindert ist, kann es weniger Ethidiumbromid aufnehmen und seine Dichte bleibt weitgehend unverändert. Die erzielte Trennung zwischen den Komponenten ist sehr scharf und auch im präparativen Maßstab möglich. Für unsere Fragestellung hat diese Methode allerdings einen bestimmten Unsicherheitsfaktor, so daß wir sie bisher weitgehend außer acht lassen mußten. Es wird angegeben, daß sich der Farbstoff durch Dialyse leicht herauswaschen läßt. Es läßt sich aber nicht mit Sicherheit feststellen, ob er bei der Dialyse wirklich quantitativ ent-

fernt wird oder ob die Struktur evtl. irreversibel geschädigt worden ist. Für alle Untersuchungen der Matrizenfunktion muß so isolierte DNA so lange ungeeignet bleiben, bis diese Fragen beantwortet sind.

Die CsCl-Technik erlaubt die Untersuchung einer weiteren Besonderheit der Mitochondrien-DNA. Während sich Kern-DNA leicht denaturieren läßt, ist das bei Mitochondrien-DNA normalerweise nicht möglich. Unter Denaturierung von DNA versteht man die Trennung der beiden DNA-Stränge, die sich auf zwei Wegen leicht erreichen läßt:

1. Durch Erwärmen der gelösten DNA auf mindestens 5^{o} über den Schmelzpunkt der DNA, das heißt man erhitzt sie auf 100^{o}. Nach ca. 10 Min. ist die Denaturierung in der Regel vollständig, was sich am Verschwinden der für Kern-DNA charakteristischen hohen Viskosität bemerkbar macht, außerdem nimmt die OD zu. Läßt man die Lösung langsam erkalten, wird der ursprüngliche Zustand zum größten Teil wieder hergestellt, das heißt die Stränge lagern sich wieder in annähernd der gleichen Weise zusammen, sie "renaturieren". Schreckt man die Lösung jedoch durch Eintauchen in Eiswasser ab, so bleibt der denaturierte Zustand erhalten.
2. Durch Erhöhung des pH-Wertes der Lösung auf pH 12 - 14. Nach dem Neutralisieren tritt der alte Zustand allmählich wieder ein; vollständig wird er jedoch in keinem Fall wieder erreicht. Wahrscheinlich handelt es sich dabei um ein statistisches Problem, da die ursprünglichen komplementären Basenpaarungen sich nicht wieder vollständig herstellen lassen.

Bei der Mitochondrien-DNA findet man jedoch vollkommen andere Bedingungen. Eine Denaturierung der DNA läßt sich zwar durch Messung der Dichte oder der Hyperchromicität nachweisen; es gelingt jedoch nicht ohne weiteres, die denaturierte DNA zu isolieren, das heißt sie renaturiert spontan. Die Ursachen für dieses Phänomen sind noch nicht

vollständig geklärt. Man nahm zunächst an, daß sich die Stränge der DNA nicht vollständig separieren, aber das ließ sich durch physikalisch-chemische Messungen nicht bestätigen. Bei zirkulärer Phagen-DNA ist jedoch bekannt, daß sich bestimmte Sequenzen auf dem Strang öfter wiederholen ("repitious sequences"), so daß die Renaturierungschance steigt. Bei mitochondrialer DNA sind diese Sequenzen bisher noch nicht sicher nachgewiesen worden, aber ein ähnlicher Mechanismus wird auch hier diskutiert.

Die bisher einzige Möglichkeit zur Isolierung der beiden verschiedenen DNA-Strängen besteht darin, die alkalische Denaturierung in einem CsCl-Gradienten ablaufen zu lassen. Da normalerweise ein Strang der DNA GC-reicher ist als der andere und ein erhöhter GC-Anteil auch die Dichte erhöht, können die beiden Stränge im Dichtegradienten getrennt werden. Nach Untersuchungen von BORST et al. (1,10) ist der GC-reiche ("heavy strand") Strang der eigentlich codierende Strang. Definitionsgemäß ist immer nur ein Strang der Träger der Information, während der zweite komplementäre Strang nur eine Rolle bei der Replikation der DNA spielt. Die Befunde von BORST wurden mit Hilfe der Hybridisierungstechnik erhoben, das heißt man läßt die radioaktiv-markierten Stränge der DNA mit mitochondrialer RNA reagieren und nimmt dann an, daß der Strang, der die höchste RNA-Radioaktivität aufweist, auch in vivo der eigentlich codierende Strang ist. Die Schwierigkeit liegt aber im mitochondrialen System darin, daß es bis heute praktisch unmöglich ist, eine reine intakte Mitochondrien-RNA zu isolieren. Das bedeutet, daß die RNA vorwiegend aus Bruchstücken besteht. Überdies besteht mitochondriale RNA vorwiegend aus ribosomaler RNA. Klarheit darüber könnte man vermutlich besser gewinnen, wenn man die isolierten DNA-Stränge im Polymerase-System als Matrize einsetzt. Entsprechende Versuche sind bei uns geplant.

2. Untersuchung der DNA-Polymerase-Reaktion

Die Untersuchung der DNA-Synthese kann auf zwei verschiedene Arten durchgeführt werden:

1. In-vivo durch Injektion einer radioaktiv-markierten Vorstufe der DNA, zum Beispiel ^{3}H-Thymidin. Nach Isolierung und Messung der Reaktionsprodukte kann man dann Rückschlüsse auf den Reaktionsverlauf ziehen. Diese Methode hat den Vorteil, daß das enzymatische System nicht verändert worden ist und artificielle Reaktionsprodukte nicht zu erwarten sind. Bei der Untersuchung von Induktions- und Hemmungsvorgängen können die natürlichen Parameter wie Transport, Permeabilität und Poolgröße voll berücksichtigt werden. Ihr Nachteil liegt darin, daß man die Charakteristika des Enzyms nur schlecht bestimmen kann.
2. In-vitro durch Messung der DNA-Polymerase im isolierten Zellpartikel oder bei löslichen Enzymen auch im Überstand des jeweiligen Zellpartikels nach dessen mechanischer, enzymatischer oder chemischer Fragmentierung. In diesem System kann das Enzym charakterisiert werden, man muß aber unter Umständen berücksichtigen, daß das Enzym durch den Verlust seiner natürlichen Umgebung in seiner Funktion beeinträchtigt sein kann. Das zeigt sich bei der mitochondrialen DNA-Polymerase darin, daß statt der natürlichen doppelhelicalen DNA einsträngige denaturierte DNA als Matrize bevorzugt wird und daß offenbar der Ablösevorgang der neusynthetisierten DNA von der Matrize gestört ist, da die Reaktion nach relativ kurzer Zeit nicht mehr linear verläuft. Man kann sich diese Artefakte durch das Fehlen von Kofaktoren erklären, die während der Isolierungsprozedur abdissoziiert oder durch konformative Änderungen am Enzym-Komplex. Trotzdem stellt dieses Verfahren häufig die einzige Möglichkeit dar, genauere Informationen über ein enzymatisches System zu bekom-

men, und man muß dann versuchen, die so gewonnenen Daten in Übereinstimmung mit dem Metabolismus des lebenden Organismus zu bringen.

2 a. Reinigung der mitochondrialen DNA-Polymerase

Bei den Versuchen mit mitochondrialer DNA-Polymerase kann man zunächst von intakten Mitochondrien, die nach dem bereits beschriebenen Gradientenverfahren isoliert worden sind, oder von einer Suspension, die durch mechanische Zerkleinerung der Mitochondrien mit dem Ultra-Turrax-Homogenisator (Firma Jancke & Kunckel, Freiburg) gewonnen wurde, ausgehen. Die Ultra-Turrax-Behandlung erfolgt 3 x 30 Sekunden. Das Probenröhrchen befindet sich dabei in einem Eis/NH_4Cl-Kältebad. Die Behandlung darf nicht über 30 Sekunden ausgedehnt werden, um zu verhindern, daß sich die Proben zu sehr erwärmen. Da die DNA-Polymerase im Gegensatz zur RNA-Polymerase löslich und nicht strukturgebunden ist, kann man die Mitochondrienbruckstücke abzentrifugieren (90 Min. im Rotor 65 bei 65 000 U/Min.; g_{max} = 368 000) und den klaren Überstand zur Messung benutzen. Da das Enzym außerordentlich labil ist, werden der Mitochondrien-Suspension zum Stabilisieren vor der Zentrifugation 20% Glycerin zugesetzt. An dieser Stelle kann der Fraktionierprozeß unterbrochen werden. Wenn man die Präparation in flüssigem Stickstoff einfriert, tritt nur ein geringfügiger Aktivitätsverlust ein und das Enzym ändert seine Eigenschaften kaum. Weiter läßt sich das Enzym durch Fraktionierung an Sepharose 6B reinigen. Die Chromatographie erfolgt aufsteigend an einer Säule von 2,5 cm Ø und 25 cm Länge, die mit 0,05 M KCl + 30% Glycerin, pH 7,5 äquilibriert ist.

Der hier angewandte enzymatische Ansatz wurde in der vorliegenden Form im wesentlichen von NEUBERT et al. (65,68) erarbeitet. Für optimale Reaktionsbedingungen enthält das

System 1 mM an dATP, dGTP und dCTP. Das vierte Desoxynucleotid-triphosphat dTTP wird als ^{3}H-TTP (2o µCi; spez. Aktivität = 5 Ci/mmol), das heißt der Ansatz ist 4 µM an dTTP, zugesetzt. Das dTTP-Molekül ist spezifisch in der Methylgruppe tritiert (Firma New England Nuclear, Dreieichenhain und Firma Buchler (Amersham), Braunschweig). Weiterhin enthält das System 5 mM Mg^{2+}, da das Enzym streng abhängig von zweiwertigen Kationen ist. Als Energielieferant dient ATP (5 mM) und der pH beträgt 7,8. Als Matrize dient Kern- und Mitochondrien-DNA in Konzentrationen von 5 - 100 µg/Ansatz, normalerweise werden 10 und 50 µg verwandt. Die Reaktion wird mit 0,2 ml Enzymlösung gestartet. Die Inkubationszeit im Wasserbad von 37° beträgt 5 Minuten. Danach wird die Reaktion durch Hinzufügen von 5 ml 0,2 n $HClO_4$ gestoppt; ggf. werden zur Vergrößerung des Niederschlages noch einige Tropfen einer Rinder-Serumalbuminlösung zugesetzt. Die Probenröhrchen werden dann sofort auf ca. 0° gekühlt, um zu verhindern, daß eine Nukleinsäurekomponente vorzeitig von der Säure hydrolysiert wird. Dann wird die überschüssige, nicht eingebaute Aktivität durch viermaliges "Waschen" (resuspendieren in 0,2 n $HClO_4$ und abzentrifugieren bei 5 000 U/Min.) entfernt. Nach dem letzten Waschen wird das Sediment in 1 bzw. 2 ml 0,5 n $HClO_4$ aufgenommen und 15 Minuten bei 75° im Wasserbad erhitzt, um die DNA zu hydrolysieren. Jeweils ein Aliquot davon wird dann zur Ermittlung der spezifischen Aktivität zur DNA-Bestimmung nach BURTON (16) und zur Messung der Radioaktivität im Liquid Scintillation Counter eingesetzt. Das von uns verwandte Zählgemisch enthält in 1 l Toluollösung 4 g 2,5-Diphenyloxazol (PPO) und 50 mg 1,4-bis-2(4-Methyl-5-phenoxazolyl)-benzol (Dimethyl-POPOP). Einem Liter dieses Zählgemisches werden zur Verbesserung der Löslichkeit wässriger und auch saurer Proben 0,5 l Triton X 100 (Firma Serva, Heidelberg) zugesetzt. Man kann mit 10 ml dieses Gemisches maximal 2 ml Wasser mischen; bei sauren Proben verringert sich diese Menge etwas. Bei der Messung in einem Szintillations-

zähler Tricarb 3380 der Firma Packard, La Grange Ill., USA mit externer Standardisierung findet man Quenchwerte von 0,55 - 0,6. Das entspricht bei ^{3}H einer Zählausbeute von ca. 25 - 28% und bei ^{14}C 90 - 94%. Nach Ermittlung der spezifischen Aktivität der DNA werden diese Werte auf den Proteingehalt der Enzymlösung bezogen. Die Proteinbestimmung erfolgt nach der Biuretmethode am Eppendorf-Photometer.

b. Untersuchung der DNA-Synthese in-vivo

Für diese Untersuchungen wird an Stelle des Nucleosid-triphosphates das Nucleosid verwandt, da Triphosphate nicht in die Zelle permieren. Am zweckmäßigsten wird auch hier das Nucleosid des Thymins appliziert, da dieser Baustein nur in der DNA vorkommt (in der RNA entsprechend Uracil); die Phosphorylierung zum Thymidin-triphosphat erfolgt dann im Organismus (Thymidin-Kinase). Die Applikation erfolgt intraperitoneal, das heißt durch Injektion in den Bauchraum oder besser i.v.. Bei Verwendung von ^{3}H-Thymidin injizieren wir 0,5 - 1 mCi/kg Ratte; die Verweilzeit im Tier beträgt meistens 24 Stunden, damit nicht eingebautes Thymidin in der Zwischenzeit aus dem Organismus entfernt wird. Bei kürzeren Einbauzeiten kann man auch nach einer bestimmten Zeit inaktives Thymidin in 1 000-fachem Überschuß nachinjizieren, um so durch "Verdünnung" des radioaktiven Thymidins dessen Einbau weitgehend zu unterbrechen (chase). Die Isolierung der verschiedenen DNA-Fraktionen erfolgt dann in der bereits angegebenen Weise. Man wird diese Methode vor allem dann wählen, wenn man in-vivo die Wirkungsweise von Substanzen, die in den DNA-Stoffwechsel eingreifen, untersuchen will.

c. Bestimmung der Verteilung der Radioaktivität in verschiedenen Zellkomponenten von embryonalem Gewebe und von Lebergewebe nach Vorbehandlung mit Pharmaka

Will man genauere Angaben über Verbleib und Wirkungsweise von Pharmaka im Organismus machen, ist es zweckmäßig, radioaktivmarkierte Substanzen zu applizieren und deren Verteilung im Organismus zu untersuchen. Diese Methode ist besonders dann vorzuziehen, wenn der pharmakologische Effekt durch außerordentlich kleine Mengen des Pharmakons bewirkt wird. Dies ist bei den alkylierenden Verbindungen sicher der Fall. Prinzipiell besitzt bei derartigen Untersuchungen eine Tritium-Markierung erhebliche Nachteile gegenüber einer Markierung des Pharmakons mit ^{14}C. Der Preis für ^{14}C-markierte Substanz ist für in-vivo Versuche benötigten Menge jedoch kaum tragbar. Eine Abspaltung des Tritiums aus dem Pharmakon spielt bei der von uns durchgeführten Isolierung reiner Zellbestandteile (DNA) jedoch eine untergeordnete Rolle. Wir haben vor allem mit ^{3}H-Endoxan gearbeitet, einer Substanz, die bifunktionell alkylierende Eigenschaften besitzt, nach "Aktivierung" im Organismus. Dadurch, daß es die Zellvermehrung hemmt, besitzt Endoxan eine gewisse Bedeutung in der Krebstherapie.

C. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

1. Charakterisierung der mitochondrialen DNA-Polymerase

Zur Charakterisierung einer Enzym-Reaktion können heute prinzipiell zwei Wege beschritten werden:

1. kann der Versuch gemacht werden, das Enzym mit möglichst hohem Reinheitsgrad - möglichst kristallin - zu isolieren und dann auf seine Eigenschaften hin zu untersuchen. Dieser Weg ist bisher in der Biochemie bei einer großen Zahl von Proteinen - besonders solchen mit kleinem Molekulargewicht - beschritten worden und gilt als ein "klassisches" Verfahren in der Enzym-Chemie.
2. Bei einigen Multienzym-Komplexen ist die Funktion jedoch so fest an eine - mindestens teilweise - Intaktheit einer bestimmten Zellstruktur gebunden, daß eine Loslösung der Proteinmoleküle von der Struktur und der Versuch einer Isolierung der Enzyme mit einem weitgehenden Funktionsverlust verbunden ist. Dies gilt zum Beispiel für die Multienzym-Komplexe der oxydativen Phosphorylierung, die fest an die Struktur der Mitochondrien-Membranen gebunden sind und auch für bestimmte "mixed-function oxidases", die eine oxidative Umwandlung von Fremdstoffen in den Leber-Mikrosomen katalysieren. Es erhebt sich damit die Frage, ob in einer Reihe von Fällen eine reine Darstellung von Enzymproteinen überhaupt erstrebenswert ist, wenn damit Veränderungen an der Struktur des Fermentkomplexes verbunden sind - die häufig nur schwer auszuschließen sind - und die zur Isolierung von "Artefakten" führen, die eine andere Reaktion katalysieren als der Enzymkomplex in-vivo durchführt. Dies gilt,zu mindests zum Teil, auch für Polymerase-Reaktionen bzw. für Untersuchungen des "Replikase-Komplexes", bei dem zur Zeit noch weitgehend unklar ist, welche Komponenten

an der Reaktion beteiligt sind.

Die DNA Poylmerase besitzt zwar gegenüber der mitochondrialen RNA-Polymerase den großen Vorteil, daß sie ein lösliches Enzym ist, aber wenn die natürliche Struktur der Mitochondrien zerstört ist, wird sie extrem labil, das heißt die enzymatische Aktivität sinkt rasch ab. Andererseits katalysiert das Enzym nun die wahllose Aneinanderreihung von Nucleotiden: es geht zunehmend in eine "terminale Nucleotidyltransferase" über. Die Bildung dieses Artefakts läßt sich leicht durch Weglassen von drei der vier Desoxynucleotid-triphosphate aus dem Reaktionsansatz prüfen: während die DNA-Polymerase kaum eine Aktivität zeigt, bildet das "terminale" Enzym dann Ketten aus nur einem Nucleotid bzw. es heftet dieses Nucleotid an bestehende Polynucleotidketten an. Die zweite Gefahr bei einer hochgradigen Reinigung besteht darin, daß die Polymerase wahrscheinlich in einem mehr oder minder festen Komplex mit anderen Enzymen wie Nucleotidasen, Ligasen u.ä. vorliegt. Durch die Reinigung wird dieser Komplex weitgehend zerstört, so daß der Aussagewert von Enzym-Präparationen durchaus zweifelhaft sein kann. Wir beziehen deshalb unsere Aussagen vorwiegend auf Ergebnisse, von Untersuchungen, bei denen die Polymerase in intakten Mitochondrien oder nach mechanischer Zerstörung der Mitochondrien-Struktur mit dem Ultra-Turrax-Gerät untersucht wurde. Die Parameter des Testansatzes entsprechen weitestgehend denjenigen, die von NEUBERT et al. (64,68) für dieses System erarbeitet wurden. Die erste Aufgabe bestand darin, Bedingungen zu ermitteln, unter denen die enzymatische Aktivität möglichst wenig abnimmt und die Umwandlung in die terminale Nucleotidyltransferase so weit wie möglich unterbleibt.

a. Versuche zum Herauslösen und Anreichern von DNA-Polymerase aus Mitochondrien

In der Literatur wird als Methode zum Aufbrechen der

Mitochondrien-fraktion	dpm ^{3}H-TTP eingabaut/o,2 ml Ferment-Präparation	Protein mg/o,2 ml	DNA-Polymerase-Aktivität dpm/µg Protein
A. "Gradienten-" Mitochondrien	23.8oo	5	5
B.a. nach Ultra-Turrax-Behandlung von A. (3 x 3o sec.)	6o.2oo	4	15
B.b. Überstand von B.a. nach 9o Min. Zentrifugation bei 65.ooo U/min. (4°C)	35.2oo	1	35
C.a. nach "freezing-thawing" von 1. (4 x: - 3o° ⟷ 0°C)	4o.1oo	4	1o
C.b. Überstand von C.a.	2.o3o	o,4	5

Tabelle: 1 Aktivität mitochondrialer DNA-Polymerase in Abhängigkeit von der Vorbehandlung der Rattenleber-Mitochondrien.

Anteile der gleichen Mitochondrien-Präparation wurden dem Verfahren B. bzw. C. unterworfen und die Aktivität der DNA-Polymerase direkt nach der Fragmentierung der Zellpartikel gemessen. Anschließend wurden die Mitochondrien-Membranfragmente durch Zentrifugation entfernt und die DNA-Polymerase-Aktivität im klaren Überstand bestimmt.

Die Streuung (Standardabweichung) beträgt bei Bestimmung der gleichen Fermentpräparation (Drei- bis Vierfachbestimmung routinemäßig) ± 5 - 1o %. Der Versuchsansatz ist im Abschnitt "Methodik" angegeben mit Zusatz von 5o µg/ml Zellkern-DNA.

Mitochondrien und damit zum Herauslösen der DNA-Polymerase wiederholtes Einfrieren und Auftauen ("freezing-thawing") angegeben. Da bei uns im Gegensatz dazu die mechanische Fragmentierung der Membran mit dem Ultra-Turrax-Gerät bevorzugt wird, haben wir beide Verfahren vergleichend untersucht. (Tabelle 1)

Die Ultra-Turrax-Behandlung wurde bereits im Kapitel "Methodik" beschrieben; für das "freezing-thawing" wurden die Mitochondrien dreimal in Trockeneis-Aceton (ca. -78° C) eingefroren und in kaltem Wasser wieder aufgetaut. Nach dieser Behandlung erreicht die DNA-Polymerase-Aktivität der Suspension nur 65% der Aktivität, die nach Ultra-Turrax-Behandlung der Mitochondrien gemessen wird. Nach dem Abzentrifugieren der Membran-Bruchstücke bei 65 000 U/Min. (Rotor 65 der Spinco-Ultrazentrifuge) zeigt der Überstand nur eine Aktivität von etwa 10% verglichen mit einer entsprechenden Behandlung nach mechanischem Aufbrechen (Ultra-Turrax). Der Anteil der terminalen Nucleotidyl Transferase - hier noch ohne Zusatz eines Stabilisators gemessen - liegt nach "freezing-thawing" deutlich höher.

Die geringe enzymatische Aktivität nach "freezing-thawing" könnte sowohl auf eine höhere Aktivität hydrolytischer Enzyme als auch auf eine unzureichende Zerstörung der Mitochondrien und unvollständige Ablösung der Polymerase von Membranstrukturen zurückzuführen sein. Wahrscheinlich trifft die zweite Möglichkeit zu, da nach dem "freezing-thawing" die Aktivität gegenüber intakten Mitochondrien verdoppelt ist und erst nach dem Zentrifugieren der Aktivitätsverlust auftritt.

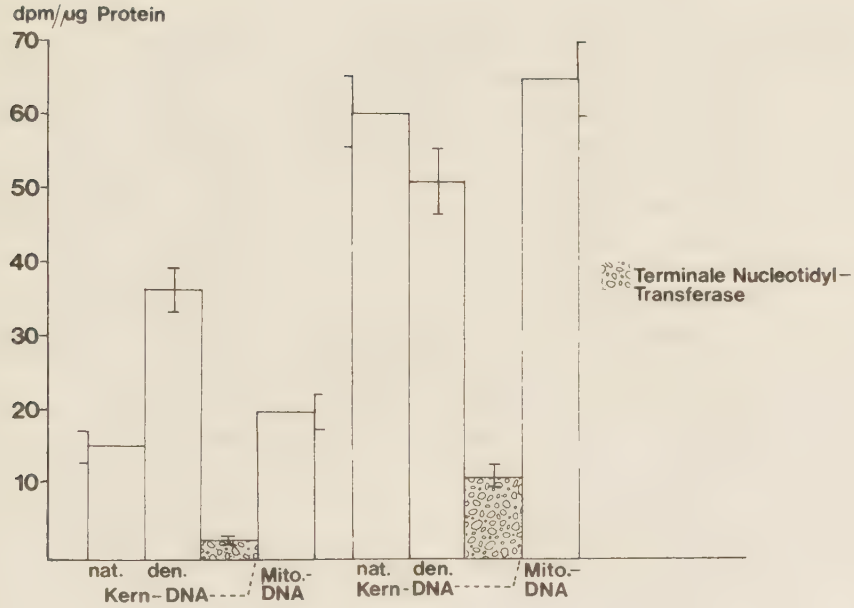


Abbildung 6 :

Anreicherung von mitochondrialer DNA-Polymerase aus Rattenleber durch Fraktionierung des Ultrazentrifugenüberstandes an Sepharose 6 B.
Auf der linken Seite der Darstellung ist die DNA-Polymerase-Aktivität vor und rechts nach der Fraktionierung dargestellt. Die Chromatographie erfolgte aufsteigend an einer Säule von 2,5 cm Ø und 18 cm Länge. Die Ausschlußgrenze von Sepharose 6 B ist $\overline{M} = 4 \times 10^6$.

b. Anreicherung der mitochondrialen DNA-Polymerase durch Chromatographie an Sepharose 6 B

Mit der löslichen DNA-Polymerase,die wie im vorigen Abschnitt beschrieben gewonnen wurde, haben wir einige Versuche zur Anreicherung angestellt. Durch Fraktionierung an einer Sepharose-6 B-Säule konnte eine etwa 4-fache Anreicherung erzielt werden (Abb. 6). Dies entspricht etwa einer Anreicherung, wie sie - mit ganz anderer Methodik - von SIMPSON und Mitarbeitern (58) und von KALF (39) beschrieben wurde. Wir sprechen in diesem Zusammenhang nicht wie die anderen Autoren von einer mindestens 10-fachen Reinigung gegenüber "intakten" Mitochondrien, da ein solcher Vergleich mit der Aktivität von "intakten" Mitochondrien unserer Meinung nach nicht zulässig ist. In "intakten" Mitochondrien wird nämlich die Aktivität in Gegenwart von endogener DNA bestimmt. Eine "Sättigung" des Enzyms mit exogener DNA ist bei weitgehend erhaltener Membranstruktur nicht möglich. Da nach allen heute bekannten Anhaltspunkten das Enzym in den Mitochondrien im Überschuß vorliegt, ist eine Bestimmung der maximalen DNA-Polymerase-Aktivität an "intakten" Mitochondrien nicht möglich.

Ähnlich wie bei Untersuchungen, die etwa gleichzeitig in anderen Laboratorien durchgeführt wurden (39, 58) hat das Enzym bei unseren Versuchen zur Anreicherung seine Eigenschaften verändert: So wird denaturierte DNA von dem angereicherten Ferment vergleichsweise schlecht abgelesen und vor allem ist der Anteil der terminalen Nucleotidyl Transferase deutlich erhöht. Eine solche Veränderung der Eigenschaften der DNA-Polymerase beim Versuch der Anreicherung geht auch aus den Daten der anderen Autoren hervor - sogar noch ausgeprägter als in unseren Versuchsserien - wurde offenbar von den anderen Untersuchern nicht für erheblich gehalten..

	DNA-Polymerase-Aktivität dpm/µg Protein					
	sofort nach UT-Behandlung untersucht		2,5 Std. nach UT-Behandlung untersucht		65.000 U/min.-Überstand von I.	
	I.	%(I.2=100%)	II.	% von I.	III.	% von I.
1. "Gradienten"-Mitochondrien vor UT	5					
2. 3 x 30 sec. UT-Behandlung von 1.	20	100 %	16	80 %	35	175 %
3. 5 x 30 sec. UT-Behandlung von 1.	19	95 %				
4. 3 x 30 sec. UT-Behandlung von 1. + 50 µg DNA nach UT	18	90 %	14	70 %		
5. 3 x 30 sec. UT-Behandlung von 1. + 10 % Glycerin nach UT	20	100 %			30	150 %
6. 3 x 30 sec. UT-Behandlung von 1. + 30 % Glycerin nach UT	25	125 %	24	120 %	40	200 %
7. 3 x 30 sec. UT-Behandlung von 1. + 50 % Glycerin nach UT	19	95 %			24	120 %
8. 3 x 30 sec. UT-Behandlung von 1. + 1 mM Cleiands-Reagenz nach UT	20	100 %	18	90 %	34	170 %
9. 3 x 30 sec. UT-Behandlung von 1. + 1 mg/ml Rinderserumalbumin nach UT	19	95 %			14	70 %

Tabelle: 2 Untersuchungen zur Stabilisierung von mitochondrialer DNA-Polymerase aus Rattenleber nach verschiedenen Vorbehandlungen der Mitochondrien.

Bedingungen des DNA-Polymeraseversuchs s. Abschnitt "Methodik".

UT = Ultra-Turrax-Homogenisator

Wir sind der Meinung, daß eine Untersuchung eines solchem Enzyms mit deutlich veränderten Eigenschaften kaum aussagekräftig ist und wir haben daher fast alle der folgenden Versuchsserien mit dem weniger angereicherten 65 000 U/Min.-Überstand durchgeführt.

c. Versuch zur Stabilisierung der DNA-Polymerase

In diesem Zusammenhang wurde der Einfluß von drei verschiedenen Substanzen auf die Stabilität des Enzyms untersucht: DNA, Cleland's Reagenz (Dithiothreitol) (Firma Calbiochem) und Glyzerin. Die Ergebnisse sind in der Tabelle 2 zusammengestellt. Da die DNA-Polymerase in der Zelle - mindestens zu einem Teil - assoziiert mit DNA vorliegt, schien eine Möglichkeit der Stabilisierung von DNA-Polymerase darin zu bestehen, exogene DNA der Enzym-Präparation hinzuzufügen. Der Zusatz von DNA verhindert jedoch die Aktivitätsabnahme bei längerem Stehen der Polymerase nicht. Wahrscheinlich sind für die Aggregation von Polymerase mit DNA weitere Faktoren notwendig. Da nach deren Zusatz die eigentlich zu untersuchende Reaktion zu unübersichtlich würde, wurden keine weiteren Versuche in dieser Richtung unternommen.

Cleland's Reagenz, das wir an Stelle des leicht autoxydablen Mercaptoäthanols verwandten, zeigte dagegen eine durchaus gute stabilisierende Wirkung. Am günstigsten erwies sich jedoch Glyzerin, das gut stabilisiert ohne den Anteil an terminaler Nucleotidyl Transferase wesentlich zu erhöhen. Als optimal erwiesen sich 30%. Der Befund, daß mit 30% Glyzerin-Zusatz auch bei sofortiger Untersuchung eine höhere DNA-Polymerase-Aktivität gefunden wird als direkt nach U.T.-Behandlung (Tabelle 2) ist wohl so zu erklären, daß ein gewisser Aktivitätsverlust in der kurzen Zeit bis zum Einsetzen in den Versuchsansatz und vielleicht auch

	DNA-Polymerase-Aktivität [dpm/µg Protein]	%	terminale Nucleotidytransferase [dpm/µg Protein]	Anteil der terminalen Transferase (Polymerase = 100%)
1. Ultra-Turrax-behandelte Mitochondrien	18		2	11,1%
2. Überstand von 1. nach 90 Min. Zentrifugation bei 65.000 U/min (4° C)	32	100%	3	4,4%
3. nach 24 Std. bei + 4° C	15	47%	9	60,0%
ohne Zusatz - 78° C	19	59%	8	42,0%
- 196° C	23	72%	8	34,0%
4. nach 24 Std. + 4° C	23	72%	8	34,0%
+ 30% Glycerin - 196° C	27	84%	4	14,8%

Tabelle 3: Untersuchung der Stabilität mitochondrialer DNA-Polymerase aus Rattenleber.
Beispiel eines Versuchs. Für die Versuchsserie wurde eine Mitochondriensuspension benutzt. Der Überstand nach Zentrifugation bei 65.000 U/min als Enzympräparation wurde nach 24 Stunden im Kühlschrank, nach Einfrieren in Aceton-Trockeneis oder nach Einfrieren in flüssigem Stickstoff zur enzymatischen Bestimmung eingesetzt. Versuchsansatz wie im Abschnitt "Methodik" angegeben mit Zusatz von 50 µg DNA/Ansatz.
Es handelt sich jeweils um Dreifachbestimmungen mit einer Streuung von < 10%.
Zur Bestimmung der terminalen Nucleotidyltransferase enthält der Versuchsansatz stets die gleiche Menge denaturierte Kern-DNA wie der Polymeraseansatz, während die drei Desoxynucleotide-Triphosphate dATP, dCTP und dGTP fehlen. Zwischen denaturierter und nativer Zellkern-DNA sowie Mitochondrien-DNA besteht bei der Messung der terminalen Transferaseaktivität kein Unterschied.

	DNA-Polymerase-Aktivität [dpm/ g Protein] + 50 g denaturierte DNA		native DNA		terminale Nucleotidyl-transferase-Aktivität [dpm/ g Protein]	% der Polymerase-Akt.
1. frische "Gradienten"-Mitochondrien nach UT-Behandlung	20	100%	10	100%	2	10%
2. in flüssigem Stickstoff eingefrorene "Gradienten"-Mitochondrien nach UT-Behandlung	11	55%	1	10%	0,5	4,5%
3. wie 2. jedoch die Mitochondriensuspension vor dem Einfrieren mit dem gleichen Volumen 0,32 m EDTA-Saccharose verdünnt	11	55%	1	10%	0,4	3,6%
4. wie 2., jedoch die Mitochondriensuspension vor dem Einfrieren mit dem gleichen Volumen 0,32 m EDTA-Saccharose + 30% Glyzerin verdünnt	14	70%	1	10%	0,6	4,3%

Tabelle 4 : Untersuchung der Stabilität mitochondrialer DNA-Polymerase aus Rattenleber. "Gradienten"-Mitochondrien wurden mit verschiedenen Zusätzen in flüssigen Stickstoff eingefroren und 7 Tage später rasch in kaltem Wasser aufgetaut. Nach dem Auftauen wurden die Mitochondrien 3 x 30 Sekunden mit dem Ultra-Turrax-Homogenisator behandelt und die DNA-Polymerase-Aktivität gemessen.
Beispiel einer typischen Versuchsserie.

während der Inkubation auftritt.

Durch das langwierige Isolierungsverfahren ergab sich das Problem, daß die Isolierung nicht an einem Tag abgeschlossen werden konnte. Es wurde daher systematisch die Aktivitätsabnahme nach 24 Stunden bei 4° (Kühlschrank), -70° (Tiefkühltruhe nach Einfrieren in Aceton/Trockeneis bei ca. -78°)und -196° (flüssiger Stickstoff) untersucht (Tabelle 3). Die geringste Abnahme wurde nach Einfrieren der Ferment-Präparation in flüssigem Stickstoff und raschem Auftauen im Wasserbad gefunden.

d. Aufbewahrung der Mitochondrien-Präparation über einen längeren Zeitraum

Auch in diesen Versuchsserien ergab sich, daß ein Zusatz von 30% Glycerin unbedingt notwendig war (Tabelle). Die Eigenschaften des Enzyms bleiben dabei weitgehend erhalten: Der Anteil an terminaler Transferase steigt leicht - von 10% auf 12 - 15% - an; die enzymatische Gesamtaktivität verringerte sich lediglich um 10 - 15%. Eine Ultra-Turrax-Behandlung von 3 x 30 Sekunden scheint für eine optimale Freisetzung des Enzyms aus den Mitochondrien auszureichen. Längere Behandlung verschlechtert eher die Ausbeute (Tabelle 3). Desgleichen reicht eine 90 min. Zentrifugation bei 65 000 U/Min. (max 368 000 x g) aus um alle Membranfragmente zu entfernen.

e. Einfrieren von Mitochondrien-Fraktionen vor der Ultra-Turrax-Behandlung

In weiteren Versuchsserien haben wir untersucht, ob es Vorteile bringt, die isolierten Mitochondrien sofort einzufrieren und im tiefgefrorenen Zustand bis zur Verwendung zu halten. Die Ergebnisse solcher Versuche sind in der Tabelle 4 wiedergegeben. Es zeigt sich, daß die DNA-

Endkonzentration im Ansatz	DNA-Polymerase-Aktivität Ultra-Turrax-behandelte Mitochondrien		Überstand nach 90 Min. Zentrifugation bei 65.000 U/min (4°C)	
	[dpm/µg Protein]	%	[dpm/µg Protein]	%
100 mM KCl	12	100%	20	100%
50 mM KCl	13	108%	19	95%
10 mM KCl	12	100%	19	95%
200 mM KCl	10	83%	21	105%
500 mM KCl	--	--	8	40%
100 mM NaCl	6	50%	16	80%
100 mM NH_4Cl	13	108%	20	100%
100 mM CsCl	10	83%	14	70%
100 mM K-Acetat	10	83%	22	110%

Tabelle 5 : Einfluß verschiedener KCl-Konzentrationen und verschiedener Salze auf die DNA-Polymerase-Aktivität (Mitochondrien aus Rattenleber).
Beispiel einer typischen Versuchsserie.
Die Werte geben Mittelwerte von Dreifachbestimmungen an (Standardabweichung < 10%). Versuchsbedingungen siehe Abschnitt "Methodik".

Polymerase-Aktivität tiefgefrorener Mitochondrien deutlich geringer ist als die frischer Präparationen. Eine gewisse Stabilisierung kann auch hier mit 30% Glycerin erreicht werden. Eigenartigerweise zeigt die DNA-Polymerase aus gefrorenen Mitochondrien gegenüber frischen zwei deutliche Unterschiede:

1. Die DNA-Polymerase aus gefrorenen Mitochondrien akzeptiert native DNA - auch nach einer Stabilisierung mit 30% Glycerin - sehr viel schlechter als die Polymerase aus frischen Mitochondrien. (Tabelle 4). Es sieht so aus, als wenn beim Einfrieren ein Faktor verloren gegangen ist, der für die Fähigkeit, native DNA abzulesen verantwortlich ist. Es könnte dies ein "initiation factor" sein, wie ihn BOLLUM (7) vermutet hat.
2. Genauso auffallend ist der Unterschied im Auftreten von terminaler Nucleotidyl Transferase wenn frische bzw. eingefrorene Mitochondrien getestet werden: Während in einer Vielzahl von Versuchsserien mit frischen "Gradienten"-Mitochondrien nach der Ultra-Turrax-Behandlung ein %satz von 8 - 12% gefunden wurde, ergibt die Auswertung bei Mitochondrien, die bis zur Messung 7 Tage in flüssigem Stickstoff eingefroren waren regelmäßig niedrigere Werte - um 4%!. Dieser Befund wird unabhängig davon erhalten, ob die Mitochondrien mit 30% Glycerin stabilisiert wurden oder nicht.

f. Einfluß von KCl auf die mitochondriale DNA-Polymerase

Da von anderen Autoren eine stabilisierende Wirkung hoher KCl-Konzentrationen beschrieben wird und dieses Kriterium zur Abgrenzung von Zellkern-DNA-Polymerase benutzt wird, haben wir in unserem System die KCl-Abhängigkeit sowie die Wirkung einiger anderer Salze geprüft (Tabelle 5). Im Gegensatz zu MEYER and SIMPSON (58) fanden wir keine Abhängigkeit der mitochondrialen DNA-Polymerase-Akti-

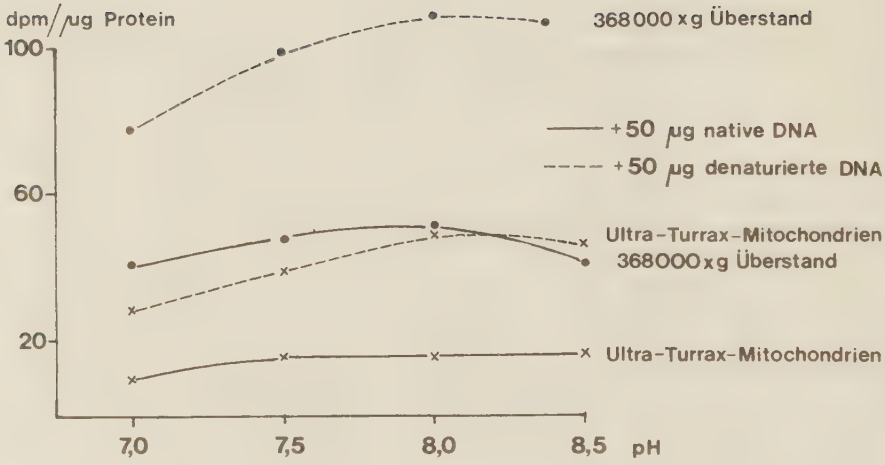


Abbildung 7 :

Aktivität mitochondrialer DNA-Polymerase.

pH-Abhängigkeit der DNA-Polymerase von Ultra-Turrax-behandelten Mitochondrien und im Überstand nach 90 Minuten Zentrifugation bei 65.000 U/Min.

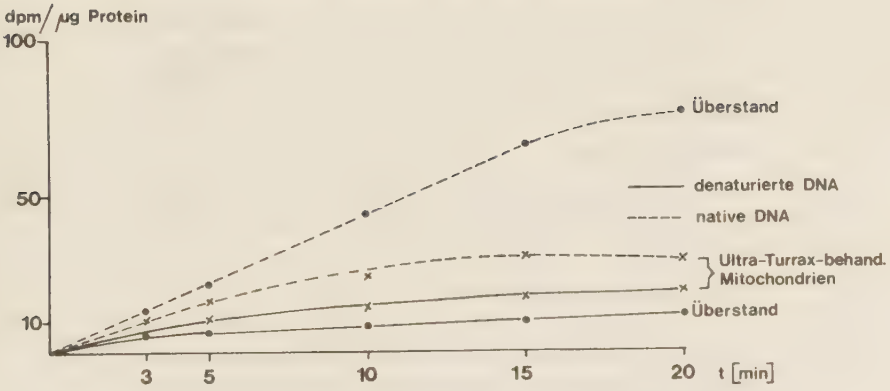


Abbildung 8 :

Aktivität mitochondrialer DNA-Polymerase.

Zeitabhängigkeit der DNA-Polymerasereaktion von Ultra-Turrax-behandelten Mitochondrien und im Überstand nach 90 Minuten Zentrifugation bei 65.000 U/Min. mit nativer und denaturierter Zellkern-DNA als Matrize.

vität von der KCl-Konzentration (Tabelle 5). Zwischen 10 mM und 100 mM ist die enzymatische Aktivität in unseren Versuchen völlig unabhängig von der KCl-Konzentration. Bei 300 mM KCl tritt dann bei "intakten" Mitochondrien eine geringfügige Verminderung der Aktivität auf. Beim löslichen Ferment ist die Aktivität auch bei dieser Salzkonzentration noch unverändert und erst bei 500 mM KCl wird eine Hemmung um 60% registriert. 100 mM NaCl sind unter unseren Versuchsbedingungen etwas ungünstiger als 100 mM KCl. Auch Ersatz der Ionen durch Cs^+ oder $Acetat^-$ bringen keine Vorteile. Die Befunde von MEYER and SIMPSON (58) können daher von uns gar nicht bestätigt werden.

g. Einige Parameter der mitochondrialen DNA-Polymerase - Reaktion

α. pH-Abhängigkeit (Abbildung 7)

Analog zu den Befunden von NEUBERT (64) an intakten Mitochondrien wies die von uns untersuchte lösliche DNA-Polymerase keine ausgeprägte pH-Abhängigkeit auf; sie durchläuft bei pH 7,8 - 8,0 ein schwaches Maximum. Wir führten deshalb unsere Versuche bei pH 7,8 durch. Das pH-Optimum liegt damit etwas stärker im alkalischen Bereich als bei der Kern-DNA-Polymerase mit pH 7,5.

β. Zeitabhängigkeit der Reaktion (Abbildung 8)

Erwartungsgemäß verläuft die enzymatische Reaktion mit fortschreitender Reinigung länger linear. Während sie in intakten Mitochondrien höchstens 5 Minuten lang linear gemessen werden kann(NEUBERT 68), beträgt dieser Zeitraum im Rohextrakt bereits 15 Minuten. Interessanterweise gilt diese Abhängigkeit aber nur für denaturierte DNA. Wird native DNA als Matrize benutzt, so kippt die Einbaurate nach kurzer Zeit um (Abbildung 8). Diese Beobach-

tung läßt sich vermutlich dadurch erklären, daß die wenigen für eine Ablesung zur Verfügung stehenden Codons auf der nativen DNA - vielleicht an Stellen umschriebener Denaturierung - schnell besetzt sind. Das von uns untersuchte enzymatische System verfügt jedoch offenbar weder über die Fähigkeit die DNA-Helix "aufzulösen" noch die neu gebildete DNA von der Matrize abzulösen. Dadurch kommt die Reaktion schnell zum Stillstand.

h. Matrizenspezifität der mitochondrialen DNA-Polymerase

Besonders für RNA-Polymerasen ist in letzter Zeit beschrieben worden, daß eine gewisse Spezifität für definierte DNA-Abschnitte einen integralen Bestandteil des Polymerase-Moleküls darstellen kann und durchaus eine Regulation auf der Ebene des Ferment-Proteins - neben der Regulation an der Matrize! - eine Rolle spielen können. Auch bestimmte Polymerasen für Virus-DNA zeigen ein hohes Maß an Spezifität. Es war daher interessant, mehr über die Matrizenspezifität mitochondrialer DNA-Polymerase zu erfahren. Einige Befunde die KALF (39) publizierte könnten dafür sprechen, daß die mitochondriale Polymerase mitochondriale DNA bevorzugt.

Wir untersuchten in diesem Zusammenhang die Spezifität der Polymerase für Mitochondrien- und Kern-DNA. Außerdem wurden in das System eingesetzt: DNA aus verschiedenen Organen des gleichen Tieres, sowie DNA aus schnell wachsenden Geweben wie zum Beispiel aus Embryonen und Tumoren und zum Vergleich dazu aus besonders alten Tieren. Weiterhin testeten wir DNA aus den Lebern verschiedener Spezies (Meerschweinchen, Kaninchen, Maus, Fisch).

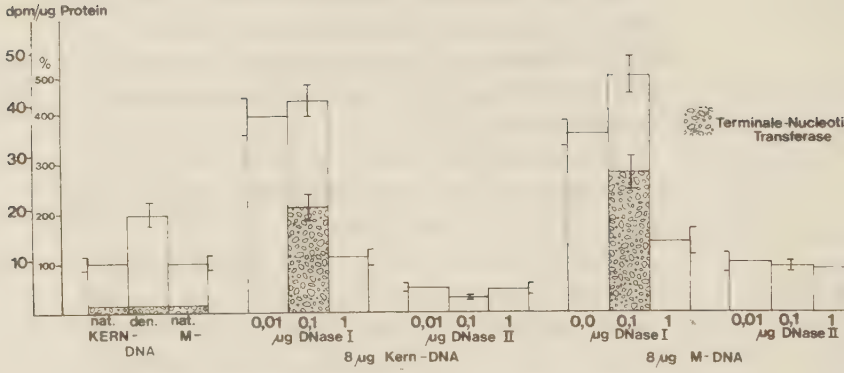


Abbildung 9 :

Vergleich der Matrizenfunktion im DNA-Polymerase-Versuch von nativer Zellkern- und Mitochondrien-DNA nach Vorbehandlung mit DNase I und II.

Die DNA wurde mit DNase I bzw. II 15 Min. bei 37°C inkubiert und anschließend zur Zerstörung der DNase 1o Min. auf 75°C erhitzt. Kontroll-DNA, die auf 75°C erhitzt wurde, war in ihrer Matrizenfunktion unverändert gegenüber unbehandelter DNA.

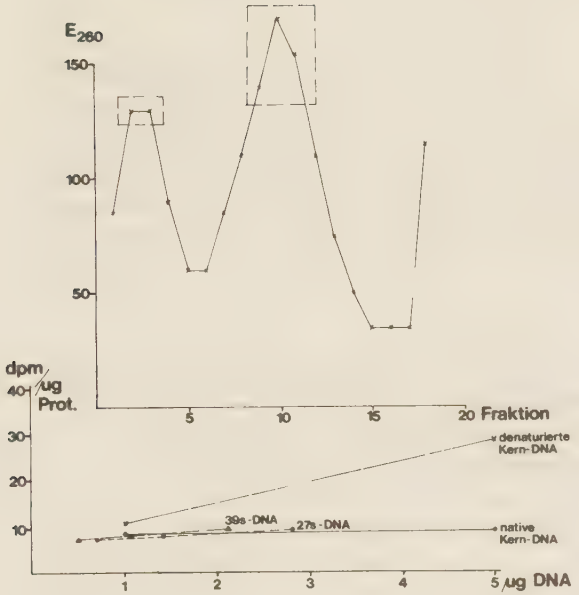


Abbildung 10:

Aktivität mitochondrialer DNA-Polymerase

Unterer Teil der Abbildung: Vergleich von nativer und denaturierter Zellkern-DNA mit 39s-("highly twisted")- und 27s-("open ring")-Mitochondrien-DNA aus Rattenleber.

Als DNA-Matrize wurden die Fraktionen 2 und 3 und 9 bis 11 aus dem präparativen Saccharose-Gradienten (195 Min. bei 64.000 U/Min. in Rotor SW65; Gradient 7 → 25 %) benutzt (siehe oberer Teil der Abbildung). Fraktion 2 und 3 entspricht der stark verknäuelten 39s-M-DNA, während Fraktion 9 bis 11 die 27s-offene Ringform darstellt.

α. Vergleich Mitochondrien-DNA und Zellkern-DNA

Da sich mitochondriale DNA, die ja normalerweise zirkulär, stark geknäult und frei von Histonen oder ähnlichen Proteinen ist, deutlich von der Kern-DNA unterscheidet, war es interessant zu erfahren, ob sich der Ablesemechanismus bei der Polymerasereaktion ebenfalls bei Benutzung von Kern-DNA oder Mitochondrien-DNA unterscheidet, das heißt ob Mitochondrien-DNA spezifisch für die Mitochondrien-DNA-Polymerase ist. Ein Befund von KALF (39) könnte in diese Richtung weisen.

Überraschenderweise zeigte sich jedoch in unseren Versuchen, daß native Kern-DNA und Mitochondrien-DNA gleichen Mengen mitochondrialer DNA-Polymerase zugesetzt, die gleiche Matrizenwirkung besitzen (Abb. 9).

Da nicht bekannt ist, welche Konformation der DNA bei der Replikation in-vivo vorliegt, sollten sowohl die 39s als auch die 27s-Form im enzymatischen Versuch mit der mitochondrialen DNA-Polymerase getestet werden. Nach den elektronenmikroskopischen Untersuchungen verschiedener Autoren an isolierter DNA sollte man erwarten, daß die 27s-Form zur Bildung der "loops", das heißt Aufweitung der Doppelhelix in den Abschnitten, die gerade abgelesen werden, geeigneter ist. Wir konnten in unseren Versuchen jedoch keinen Hinweis dafür finden, daß 27s-DNA eine bessere Matrize abgibt. 27s- wie 39s-Werte waren praktisch identisch und entsprachen vollkommen den Werten mit nativer Kern-DNA gleicher Konzentration (Abb. 10). Einschränkend muß allerdings gesagt werden, daß die uns zur Verfügung stehenden Mengen mitochondrialer DNA infolge der bereits erwähnten geringen Kapazität des Schwingrotors SW 65 L sehr gering waren.

Es ist schwer zu entscheiden, ob das von uns untersuchte Ferment - evtl. durch Verlust einer essentiellen Kompo-

nente - im Gegensatz zu dem in-vivo aktiven Enzym-System die Fähigkeit weitgehend verloren hat, native DNA zu replizieren. Wir haben daher versucht, durch Zusatz kleiner Mengen von DNase die DNA partiell zu spalten und so für den Angriff der Polymerase günstigere Bedingungen zu schaffen. Die Ergebnisse derartige Versuche sind in der Abb. 9 zusammengestellt. Heute sind zwei Typen von DNase bekannt: DNase I und DNase II, und wir haben beide Arten von Nucleotidasen benutzt.

Nach Vorinkubation von 10 µg DNA mit 0,01 µg DNase I 1 ml waren die Einbauraten in beiden Fällen (27s und 39s) wiederum gleich bei einer Erhöhung um den Faktor 8. Ein Unterschied in der Wirksamkeit von Mitochondrien-DNA und Zellkern-DNA trat nicht auf. Gleichzeitig stieg der Anteil der terminalen Transferase aif etwa 50% an. DNase II, die im Gegensatz zu DNase I die DNA-Doppelhelix an beiden Strängen gleichzeitig angreift, blieb nahezu ohne Wirkung.

Da KALF (39) bei der Isolierung der Mitochondrien-DNA die Membran durch wiederholtes Einfrieren und Auftauen zerstörte, kann vermutet werden, daß während dieses Prozesses die DNA durch DNasen bereits in gut codierende Bruchstücke verwandelt wurde. Eine Spezifität für Mitochondrien-DNA scheint nach unseren Untersuchungen nicht vorhanden zu sein.

ß. DNA aus verschiedenen Organen der Ratte

Weitere Experimente sollten zeigen, ob DNA aus verschiedenen Organen verschiedene Matrizenfunktion besitzt. Auffallenderweise ist es nicht gleichgültig, aus welchem Organ die DNA-Matrize stammt. Zum Vergleich wurde die Kern-DNA aus Niere, Milz, Gehirn und Leber der Ratte isoliert und sowohl nativ als auch denaturiert der Polymerasereak-

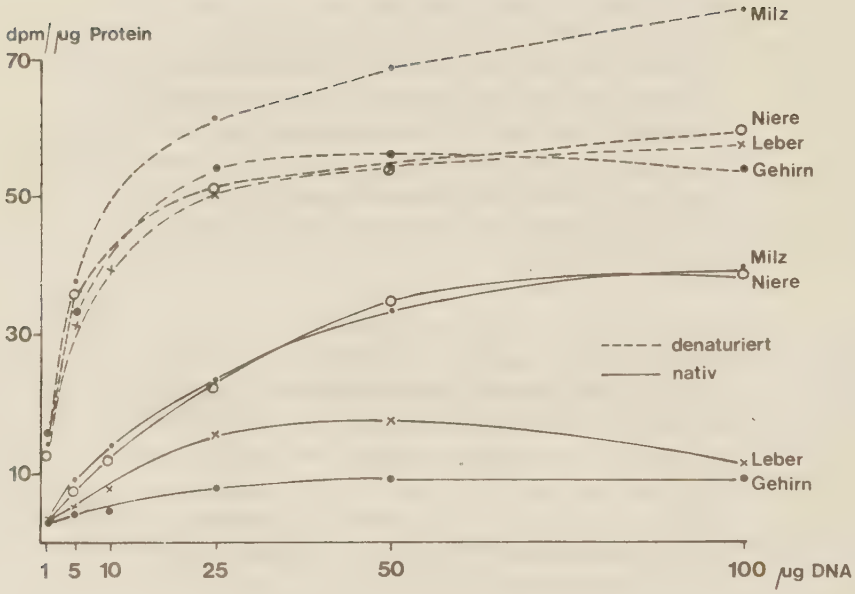


Abbildung 11 :

Aktivität mitochondrialer DNA-Polymerase

Vergleich der Matrizenfunktion von nativer und denaturierter Zellkern-DNA aus verschiedenen Organen der Ratte

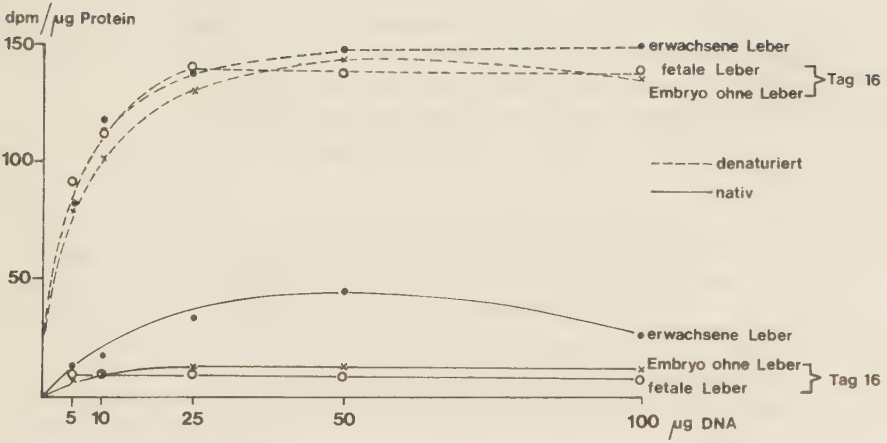


Abbildung 12 :

Aktivität mitochondrialer DNA-Polymerase

Vergleich der Matrizenfunktion nativer und denaturierter Zellkern-DNA aus fetaler und erwachsener Leber sowie dem "Rest"-Embryo ohne Leber.

Die fetalen Lebern wurden am Tag 16 der Schwangerschaft präpariert.

tion zugesetzt, wobei die Mengen von 1 - 100 µg/Ansatz variiert wurden. Bei 100 µg war unter unseren Versuchsbedingungen die Sättigung mit DNA praktisch immer erreicht; manchmal trat auch bereits eine geringfügige Hemmung auf (Abb. 11). Bei der denaturierten DNA waren die Werte für Nieren-, Leber- und Gehirn-DNA nahezu identisch, während die Milz-DNA ca 20% höher lag. Bei der nativen DNA lagen Gehirn und Leber außerordentlich niedrig, während Niere und Milz etwa in der Mitte lagen.

Versucht man diese Befunde mit Besonderheiten der jeweiligen Organe zu korrelieren, so fällt auf, daß die Milz, die zur Bildung immunokompetenter Zellen befähigt ist und eine hohe Stoffwechselaktivität besitzt, während Gehirn, ein überwiegend kaum noch proliferierendes Gewebe mit vergleichsweise wenig Zellteilungen aufweist.

Wir haben in die Untersuchungen andere schnell proliferierende Gewebe einbezogen um zu sehen ob DNA aus solchen Geweben allgemein eine besonders günstige Matrizenfunktion in unserem Testsystem besitzt. DNA aus fetalem Gewebe (Ratten-Feten, Tag 16 der Schwangerschaft) besitzt jedoch keine "primer"-Eigenschaften, die über die von DNA aus erwachsenen Geweben hinausgeht (Abb. 12).

Zur Zeit haben wir keine Erklärung für die besonders gute Matrizen-Funktion von Milz-DNA. Es müßte geklärt werden, ob immunokompetente Zellen - zum Beispiel Lymphocyten - für diesen Effekt verantwortlich sind. Versuche mit DNA aus Lymphknoten sind geplant.

Auf der anderen Seite haben wir auch keinen Anhalt dafür, warum DNA aus Gehirn eine so besonders niedrige Matrizenfunktion aufweist. Mit der Proliferationsrate des Gewebes hängt dies sicher nicht zusammen, da DNA

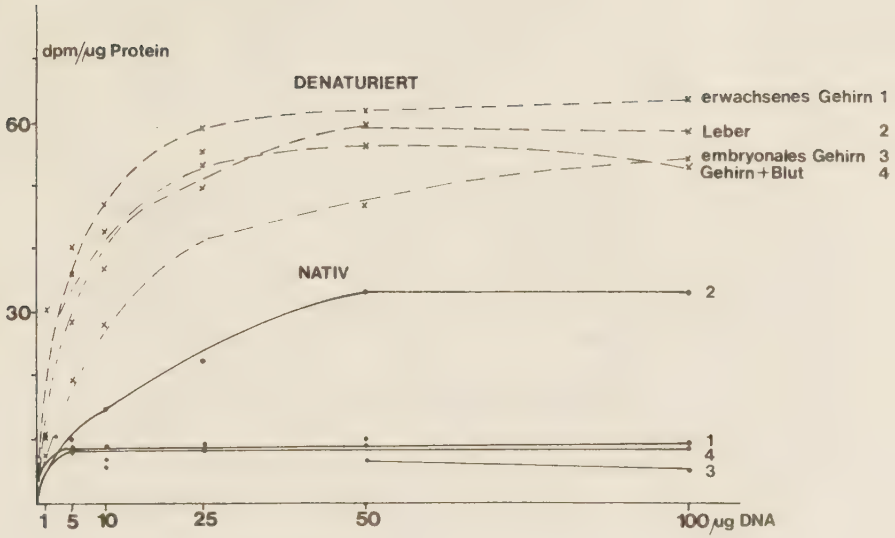


Abbildung 13:

Aktivität mitochondrialer DNA-Polymerase mit Zellkern-DNA aus verschiedenen Organen.

Vergleich von nativer und denaturierter Zellkern-DNA aus Gehirn, fetalem Gehirn (Tag 18 der Schwangerschaft), Gehirn zusammen mit Blut homogenisiert sowie aus Leber.

		DNA-Polymerase-Aktivität dpm/µg Protein + 50 µg Kern-DNA/Ansatz		terminale Nucleotidyl-transferase-Aktivität	
		nativ	denaturiert	[dpm/µg Protein]	Anteil der terminalen Transferase (Polymerase = 100%)
Mitochondrien nach Ultra-Turrax-Behandlung	Ø	16 ± 1,5	22 ± 1,3	2	9,1%
	+ 10 µg $FeCl_2$	16 ± 1,4	29 ± 2,1	2	6,9%
	+ 100 µg $FeCl_2$	17 ± 1,2	25 ± 2,1	2	8,0%
	+ 10 µg $FeCl_3$	24 ± 1,7	37 ± 3,2	2	5,4%
	+ 100 µg $FeCl_3$	26 ± 2,1	36 ± 2,8	3	8,3%
Überstand nach 90 min. Zentrifugation bei 65.000 U/min (4° C)	Ø	27 ± 2,2	35 ± 3,1	4	8,7%
	+ 10 µg $FeCl_2$	18 ± 1,1	24 ± 2,4	3	8,0%
	+ 100 µg $FeCl_2$	20 ± 1,6	23 ± 1,4	3	7,7%
	+ 10 µg $FeCl_3$	22 ± 1,9	29 ± 2,1	3	9,7%
	+ 100 µg $FeCl_3$	13 ± 0,9	28 ± 2,2	3	9,3%

Tabelle 6 : Einfluß von Fe^{2+} und Fe^{3+} auf die DNA-Polymerase-Aktivität.
Die DNA-Polymerase wurde aus Rattenleber-Mitochondrien, die DNA aus Rattenleber-Zellkernen gewonnen.
Versuchsbedingungen siehe Abschnitt "Methodik".

aus dem Gehirn von Ratten-Feten (Tag 18 der Schwangerschaft) - einem Gewebe mit hoher Proliferationsrate - auch keine bessere Matrizen-Funktion zeigt (Abb. 13).

γ. Einfluß von Fe-Ionen auf die Matrizen-Funktion von DNA

Wir sind weiterhin der Frage nachgegangen, ob die Gegenwart von Blut während der DNA-Isolierung dazu beiträgt, die Matrizen-Funktion der isolierten DNA zu verändern. Da von anderen Autoren beschrieben worden ist, daß Fe-Ionen bei der Aufweitung der DNA-Helix eine Rolle spielen, versetzten wir Gehirne beim Homogenisieren mit einem natürlichen Fe-Donator, das heißt mit Blut und isolierten daraus ebenfalls die DNA; jedoch auch hier waren in der Polymerasereaktion keinerlei Unterschiede zwischen den verschiedenen DNA-Präparationen festzustellen (Abb. 13).

Da uns die Möglichkeit, daß Fe-Ionen eine Rolle bei der Ablesung der DNA spielen könnten, bedeutsam erschien, wurden dem Polymerase-Ansatz 10 und 100 µg $FeCl_2$ bzw. $FeCl_3$ zugesetzt (Tab. 6). Dabei bewirkte zwar im Ultra-Turrax behandelte Mitochondrien das Eisen in beiden Oxydationsstufen eine Stimulierung des Enzyms, und zwar in der dreiwertigen Form stärker als in der zweiwertigen (60%). Im Ultrazentrifugenüberstand bewirkten beide eine leichte Hemmung; hier hemmte die zweiwertige Form stärker als die dreiwertige. Offenbar haben Fe-Ionen durchaus eine Wirkung auf die Polymerasereaktion; es sind dafür jedoch wahrscheinlich weitere Faktoren nötig, die eventuell strukturgebunden sind und somit bei der Zentrifugation verloren gehen. Es ist andererseits jedoch nicht übermäßig wahrscheinlich, daß dieser Effekt tatsächlich in eine Auflockerung der DNA-Helixstruktur besteht, da auch bei der Stimulierung der Polymerase die Wirkung auf die denaturierte DNA wesent-

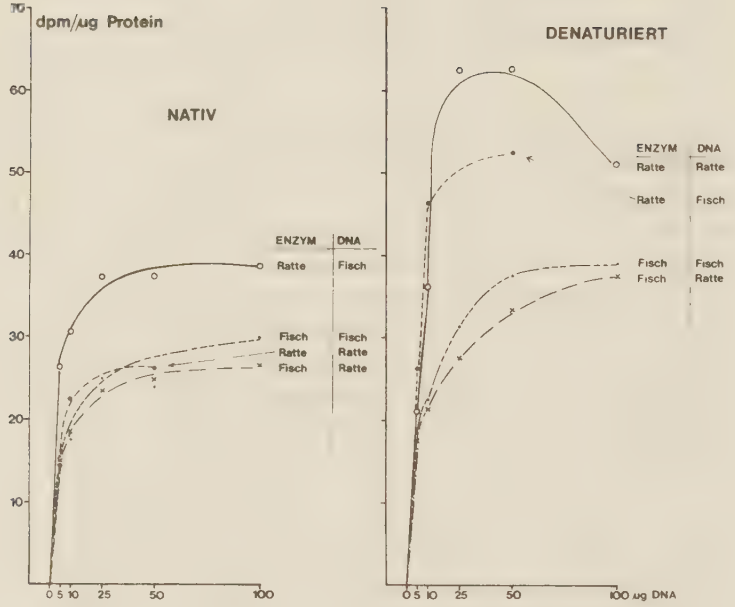


Abbildung 14:

DNA-Polymerase-"Kreuzversuch" mit Zellkern-DNA und Mitochondrien-DNA-Polymerase aus Fisch- und Rattenleber.
Versuchsansatz siehe Abschnitt "Methodik".

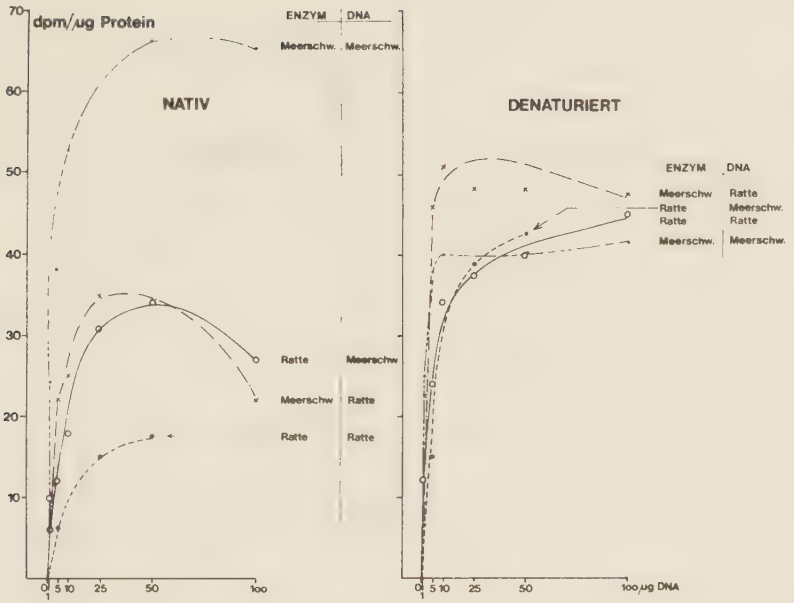


Abbildung 15 :

DNA-Polymerase-"Kreuzversuch" mit Zellkern-DNA und Mitochondrien-DNA-Polymerase aus Meerschweinchen- und Rattenleber.

Versuchsansatz siehe Abschnitt "Methodik"

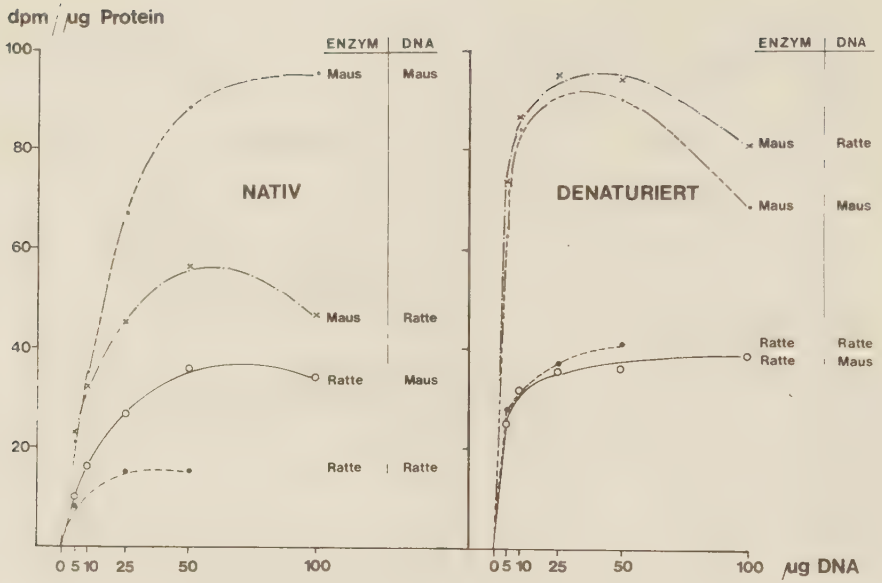


Abbildung 16 :

DNA-Polymerase-"Kreuzversuch" mit Zellkern-DNA und Mitochondrien-DNA-Polymerase aus Mäuse-und Rattenlebern.

Versuchsbedingungen siehe Abschnitt "Methodik"

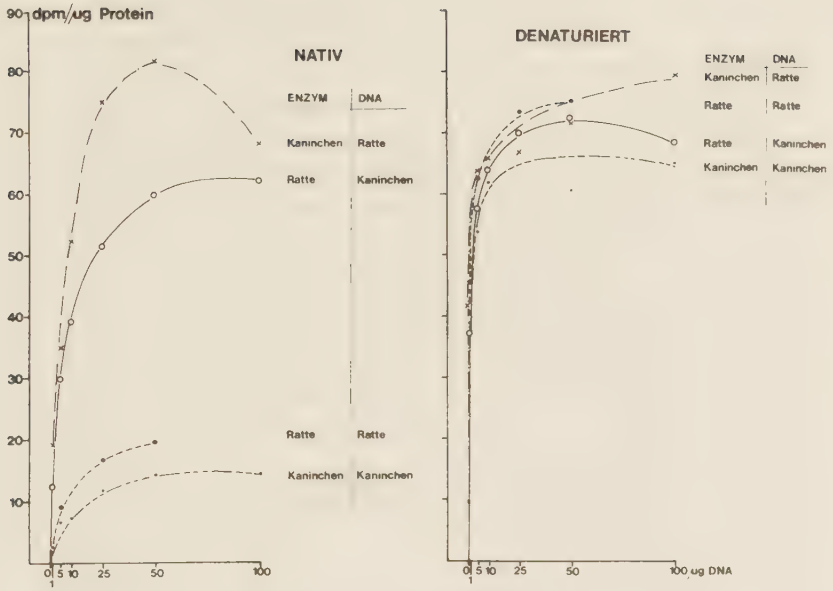


Abbildung 17:

DNA-Polymerase-"Kreuzversuch" mit Zellkern-DNA und Mitochondrien-DNA-Polymerase aus Kaninchen- und Rattenleber.

Versuchsansatz siehe Abschnitt "Methodik".

mitochondriale DNA-Polymerase aus:	zugesetzte DNA	Ratte [dpm/µg Protein]	Zellkern-DNA aus Leber von Kaninchen	Meerschwein.	Maus	Fisch
		bei Sättigung mit DNA				
1. Ratte	nativ	zu (2.) 20 | (3.) 15 | (4.) 15 | (5.) 25	[65]	34	35	40
	denaturiert	75 | 45 | 40 | 60	75	45	40	55
2. Kaninchen	nativ	[80]	25			
	denaturiert	80	65			
3. Meerschwein.	nativ	35		[65]		
	denaturiert	50		45		
4. Maus	nativ	55			[90]	
	denaturiert	95			90	
5. Fisch	nativ	25				30
	denaturiert	40				40

Tabelle 7: Vergleichende Zusammenstellung der DNA-Polymerase-Aktivität die bei "Kreuzversuchen" mit DNA-Polymerasen und DNA verschiedener Tierspezies gemessen wurden. Angegeben sind die dpm/µg Protein bei Sättigung mit DNA aus den Abb.

lich ausgeprägter ist.

In einem weiteren Versuch wurden noch DNA-Präparationen aus den Lebern verschieden alter Tiere (50 g, 200 g und 400 g) getestet. Auch hier waren keine signigikanten Unterschiede festzustellen.

Man kann damit feststellen, daß innerhalb einer Tierspezies keine wesentlichen Unterschiede bei der Verwendung verschiedenartiger DNA als Matrize für die mitochondriale DNA-Polymerase-Reaktion festgestellt werden können - unabhängig vom Entwicklungszustand oder Alter des jeweiligen Tieres; das bedeutet, daß die DNA-Polymerase aus Mitochondrien weitgehend unspezifisch ist. Nur schwer erklärbare Ausnahmen machen die DNA aus der Milz sowie die native Gehirn-DNA. Weitere Untersuchungen mit diesen DNA-Präparationen sind notwendig, um diese Unterschiede zu erklären.

6. Matrizenfunktion von DNA aus verschiedenen Tierspezies

Ganz besonders intensiv haben wir die Frage untersucht wie sich DNA von verschiedenen Tielspezies gegenüber mitochondrialer DNA-Polymerase verhält, die ebenfalls aus verschiedenen Tierspezies gewonnen wurde. Die DNA wurde in allen diesen Experimenten aus Leberzellkernen der betreffenden Tierspezies isoliert. Auch die DNA-Polymerasen wurden aus Lebermitochondriens der betreffenden Tiere gewonnen. In jedem Fall wurde eine Sättigungskurve mit den verschiedenen isolierten DNA-Präparationen durchgeführt und zwar sowohl mit nativer als auch mit denaturierter DNA. Die Ergebnisse dieser Versuchsserien sind in den Abb. 14 - 17 wiedergegeben. Eine Übersicht über die ungefähren Sättigungswerte, die unter den verschiedenen Versuchsbedingungen erhalten wurden ist in der Tabelle 7 zusammengestellt.

Wird eine mitochondriale DNA-Polymerase aus Meerschweinchenleber mit DNA der gleichen Spezies oder mit Rattenleber-DNA ausgetestet, so ergibt sich eine etwa vergleichbare Aktivität sowohl bei Verwendung von nativer DNA als auch bei denaturierter DNA.

Ähnlich liegen die Verhältnisse, wenn mitochondriale DNA-Polymerase aus Fischen (Karpfen) für den Versuch benutzt wird. Auch hier ist die arteigene Zellkern-DNA etwa so aktiv wie Ratten-Zellkern-DNA. Dies gilt auch bei dem Ferment aus Fischleber sowohl für native als auch für denaturierte DNA.

Ein deutlicher Unterschied wird bei der Auswertung von mitochondrialer DNA-Polymerase aus Mäuseleber gefunden: bei Verwendung von denaturierter arteigener DNA oder von denaturierter Rattenleber-DNA ist zwar kein Unterschied zu erkennen, bei Verwendung von nativer DNA wird jedoch die arteigene DNA deutlich gegenüber Ratten-DNA bevorzugt. Die Aktivität mit nativer Mäuse-DNA ist fast doppelt so hoch wie die Aktivität, die mit nativer Ratten-DNA gemessen werden kann.

Völlig anders und ganz besonders interessant liegen die Verhältnisse bei Verwendung mitochondrialer Kaninchenleber-DNA-Polymerase: denaturierte DNA zeigt auch hier etwa die gleiche Aktivität unabhängig davon ob die DNA aus Kaninchenleber oder Rattenleber gewonnen wurde. Wird der Versuch jedoch mit nativer DNA durchgeführt, dann erweist sich Rattenleber-DNA als etwa 5mal wirksamer als die arteigene Kaninchen-DNA!.

Der Befund daß artfremde DNA gegenüber arteigener bevorzugt wird, kann auch bei Verwendung von Rattenleber-DNA-Polymerase voll bestätigt werden. Im Falle der Rattenleber-Polymerase wurden vergleichende Untersuchungen mit einer ganz besonders großen Zahl von DNA-

Präparationen aus verschiedenen Tierspezies durchgeführt. Die Unterschiede, die bei Verwendung von denaturierter DNA aus verschiedenen Spezies gewonnen wurden sind wiederum vergleichsweise gering.

Ein großer Unterschied ergibt sich jedoch wieder, wenn native DNA in den Versuchsansatz eingesetzt wird. Eigenartigerweise ist in allen diesen Experimenten die homologe Ratten-Zellkern-DNA ein sehr viel schlechterer "primer" gewesen, verglichen mit DNA aus Lebern von Kaninchen, Meerschweinchen, Mäusen oder sogar Fischen. Während die native DNA aus den Lebern von Meerschweinchen, Mäusen und Fischen etwa doppelt so hohe Einbauwerte ergibt,wie Ratten-DNA konnte mit DNA aus Kaninchenleber sogar 3mal so hohe Einbauraten erhalten werden, wie mit der homologen DNA.

Die 4 verschiedenen Versuchsserien, die mit Ratten-DNA-Polymerase und Ratten-DNA durchgeführt wurden gestatten auch eine Aussage über die Streuung in diesen Versuchen. Die Aktivität lag in jedem Fall zwischen 15 und 25 dpm/µg Protein bei Verwendung von nativer DNA und zwischen 45 und 75 dpm/µg Protein bei Verwendung von denaturierter Ratten-DNA. Diese Streuung ist weit geringer als die Unterschiede, die mit heterologen DNA-Präparationen gewonnen wurden.

Bei diesen Versuchsserien sind zwar die Daten sehr gut miteinander zu vergleichen bei denen die gleiche Polymerase-Präparation mit verschiedenen DNA-Präparaten verglichen wurde, weniger gut vergleichbar sind jedoch die Aktivitäten der Polymerase-Präparationen verschiedener Tierspezies. Dies liegt selbstverständlich daran, daß die Fermentmenge, die aus den Mitochondrien-Präparationen gewonnen wurde und die in den Essay eingesetzt wurde bei den verschiedenen Spezies durchaus unterschiedlich sein kann. Ein Vergleich der Polymerase-Aktivitäten unterein-

ander ist daher nur bedingt möglich.

Die Experimente zeigen, daß die Matrizenfunktion verschiedener DNA-Präparationen aus verschiedenen Tierspezies durchaus nicht gleich sind, auch bei Verwendung der gleichen Polymerase-Präparation. Bei Verwendung praktisch aller Polymerase-Präparationen konnte mit 50 g DNA/Ansatz eine vollständige Sättigung erreicht werden. Die Unterschiede in der Enzymaktivität bei Verwendung verschiedener DNA-Matrizen sind zunächst schwer zu interpretieren. Wahrscheinlich spielen 2 Faktoren eine Rolle. Einmal ist es möglich, daß aus den Mitochondrien verschiedener Tierspezies der DNA-Polymerase-Komplex mit den dazugehörigen Faktoren in unterschiedlicher Weise isoliert wird, sodaß sich die Funktionen - besonders das Verhalten gegenüber nativer DNA - durchaus unterscheiden können. Auf der anderen Seite legen unsere Resultate den Gedanken nahe, daß die DNA-Präparationen von verschiedenen Tierspezies aufgrundihrer verschiedenen Basenzusammensetzung vielleicht Sequenzen enthalten, die eine Ablesung durch die DNA-Polymerase erleichtern. Bis heute ist noch sehr wenig über "Initiator-Sequenzen" bei Säugetier-DNA bekannt bei denen eine Replikation gestartet werden könnte.

Die Experimente geben jedoch einen ersten Anhalt dafür, daß mitochondriale DNA-Polymerase vielleicht doch eine gewisse Spezifität bei der Erkennung verschiedener DNA-Sequenzen besitzt. Da bei Benutzung denaturierter DNA solche Unterschiede praktisch nicht erkennbar sind könnte der Unterschied im Falle der nativen DNA dadurch zustande kommen, daß bei verschiedenen DNA-Präparationen eine Initiation das heißt ein umschriebenes "schmelzen" der DNA-Doppelhelix möglich ist.

Wir haben zunächst noch keine Erklärung dafür warum wir bei Anwendung von homologer Mitochondrien-DNA und von homologer Zellkern-DNA keinen Unterschied in der Matri-

zenfunktion finden. Es wäre interessant Untersuchungen wie wir sie mit der Zellkern-DNA durchgeführt haben auch mit Mitochondrien-DNA-Präparationen verschiedener Spezies auszuführen. Die Gewinnung genügend großer Mengen von Mitochondrien-DNA wie sie für solche Titrationsuntersuchungen benötigt wird stellt allerdings immer noch ein erhebliches Problem dar.

2. Untersuchungen zur embryotoxischen Wirkungsweise von Cyclophosphamid (Endoxan^{R})

Im Rahmen der Untersuchungen über den mitochondrialen DNA-Stoffwechsel sowie als Beitrag zur Aufklärung der Wirkungsweise embryotoxischer Pharmaka im Rahmen unseres Sonderforschungsbereiches 29 haben wir uns besonders intensiv mit der biochemisch-pharmakologischen Wirkung des Cyclophosphamids beschäftigt (N,N-Bis-(2-chloräthyl) -N,O-propylenphosphorsäureesterdiamid; Firmenname der ASTA-Werke, Brackwede: Endoxan^{R}).

Dieses Cytostaticum stellt aus der Reihe der alkylierenden Substanzen heute praktisch die einzige in nennenswertem Umfange benutzte Substanz dar. Bis heute ist unklar, warum dem Endoxan in der Tumortherapie gegenüber anderen alkylierenden Substanzen eine derartige Sonderstellung zukommt. Verglichen mit anderen alkylierenden Substanzen ist die "therapeutische Breite" verhältnismäßig groß, d.h. ein Effekt auf stark proliferierende Gewebe kann bereits mit Dosen erreicht werden, die weit unterhalb der LD5o liegen. (34, 63, 67)

Vermutlich wegen seiner ausgeprägten Wirkung auf schnell proliferierende Gewebe besitzt Endoxan auch einen embryotoxischen Effekt, der bei Versuchstieren bereits bei Dosen auftritt, die etwa 1/2o der LD5o betragen. 7 bis 15 mg/kg - das sind Dosen, die durchaus auch therapeutisch bei Menschen benutzt werden - führen mit großer Regelmäßigkeit zu embryoletalen Wirkungen und zu Mißbildungen. Die genaue Wirkungsweise, durch die dieser sehr ausgeprägte Effekt zustande kommt, ist bisher nicht bekannt. Eine nähere Analyse der embryotoxischen Wirkungsweise von Endoxan könnte daher nicht nur einen Beitrag liefern zum cytotoxischen Effekt derartiger alkylierender Substanzen, sondern man könnte auch einen Einblick

erwarten in die Induktionsvorgänge, die sich - besonders in der Phase der Organogenese - während der Embryonalentwicklung abspielen.

In der vorliegenden Arbeit wurden Untersuchungen zu folgenden Fragestellungen durchgeführt:

α) Wie groß ist die Endoxan-Menge, die bei einer Behandlung des Muttertieres mit diesem Cytostaticum den Embryo erreicht ?

β) Wie groß ist die Alkylierungsrate, die im embryonalen Gewebe und in einem Gewebe des mütterlichen Organismus (z.B. Leber) nach Endoxan-Applikation auftritt ? In diesem Zusammenhang wurde nicht nur die Kern-DNA untersucht, sondern es wurde besondere Aufmerksamkeit auch der Frage gewidmet, ob mitochondriale DNA eine andere Empfindlichkeit aufweist.

γ) Könnte bei der Wirkungsweise vom Endoxan außer einer "Vernetzung" von DNA-Strängen auch eine Vernetzung von DNA mit anderen Zellkomponenten - z.B. Proteinen - eine Rolle spielen ? Zur Klärung dieser Frage wurden die Proteine der Zellen mit radioaktiven Aminosäuren markiert und in der isolierten und rein dargestellten DNA gemessen, wieviel Radioaktivität kovalent gebunden ist.

δ) Wie verhält sich mitochondriale DNA-Polymerase nach Einwirkung von Endoxan ? Da eine DNA-Polymerase-Reaktion aus zwei Komponenten - nämlich DNA und dem Polymerase-Enzym - besteht, war zu prüfen, ob eine eventuelle Veränderung durch Modifikation der DNA-Matrize oder durch Veränderung des Enzym-Proteins zustande kommt.

ε) Wie beeinflußt eine Vorbehandlung mit Substanzen, welche die Endoxan-Umwandlung in der Leber beeinflußen, die Verteilung des Endoxans im embryonalen Gewebe und den Alkylierungsgrad embryonaler Komponenten ? Hier sollte vor allem eine Auseinandersetzung mit den Befunden von BECKER et al. stattfinden, die Anhaltspunkte dafür erbracht haben, daß der embryotoxische Effekt des Endoxans nicht unbedingt auf einer Alkylierung beruhen muß.

a. Umwandlung von Endoxan im Organismus; "aktive Form".

Endoxan, das zu den alkylierenden Substanzen vom Lost-Typ zählt, ist nur in-vivo wirksam, da es durch oxydative Umwandlung erst in die "aktive Form" umgewandelt werden muß. Dieser Aktivierungsprozess geschieht beim Säugetier durch die relativ unspezifischen "mixed function oxydases", die in den Lebermikrosomen lokalisiert sind, $NADPH_2$-und Sauerstoff-abhängig sind und in der Lage sind, eine Vielzahl körperfremder Substanzen zu oxydieren. Die oxydative Umwandlung kann prinzipiell als Hydroxylierung aufgefaßt werden. Der erste Schritt der Endoxan-Aktivierung besteht wahrscheinlich in einer oxydativen Spaltung des Phosphorsäure-Amid-Ringes, während der Lost-Anteil unverändert bleibt. Es ist zur Zeit noch unklar, ob die Spaltung vorwiegend die O-C-Bindung oder die N-C-Bindung betrifft. Wahrscheinlich entsteht ein zwitter-ionischer Metabolit, der aus der Leber an den Ort der Wirkung transportiert wird. Die peripheren Gewebe sind offenbar nur in sehr geringem Maße in der Lage, eine solche Oxydation und damit "Aktivierung" durchzuführen. Diese aktivierte Form ist einerseits erstaunlich stabil, da mit dem Urin eine größere Menge einer cytostatisch wirksamen Verbindung

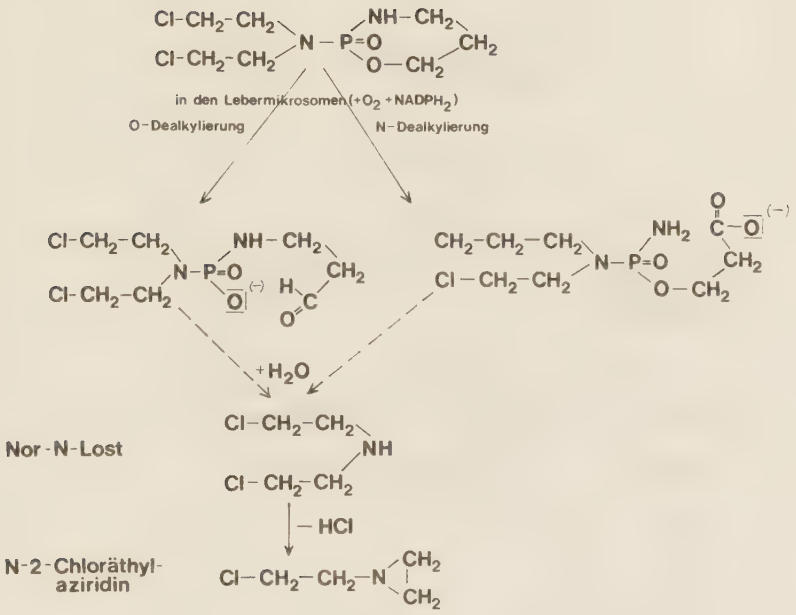


Abbildung 18 :

Schema der Endoxanaktivierung nach BROCK und HOHORST (14).
Als ein möglicher Metabolit wird neuerdings von ALARCON (2) Acrolein beschrieben, das auf dem Wege über die O-Dealkylierung entstanden sein könnte. Damit ist erstmals ein weiterer reaktionsfähiger Metabolit beschrieben worden, der einen anderen Wirkungsmechanismus als den der Lost-Alkylierung als Erklärung zuläßt.

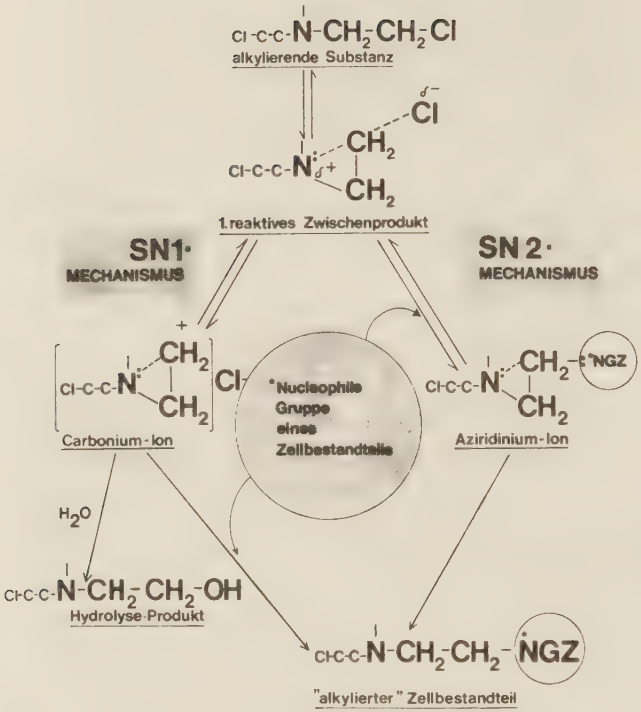


Abbildung 19:

Mechanismen bei Alkylierungsreaktionen

NGZ = Nucleophile Gruppe eines Zellbestandteils.

ausgeschieden wird, andererseits besitzt sie jedoch offenbar eine erstaunlich große "therapeutische Breite", da eine Alkylierung und damit Endoxan-Wirkung in praktisch allen Organen des Organismus nachgewiesen werden kann.

Das weitere Schicksal der "aktivierten Form" des Endoxans ist zur Zeit unklar. Nach BROCK und HOHORST (14) (siehe Schema) soll in der Zelle durch Abspaltung des Phosphat-Restes NOR-N-Lost entstehen, der - möglicherweise über eine Aziridin-Verbindung als weiteres Zwischenprodukt - für die eigentliche Wirkung verantwortlich sein soll. Untersuchungen von HELGE und eigene Untersuchungen stützen jedoch nicht die Ansicht, daß der Phosphat-Rest bei der eigentlichen Wirkung abgespalten wird. (34)

Durch weitere Umwandlung in der Leber, aber auch in den peripheren Organen, kann die aktive Form des Endoxans inaktiviert werden. Es ist zur Zeit unklar, ob diese Inaktivierung sich am Phosphat-Rest abspielt oder ob sie in einer typischen Reaktion der Lost-Gruppe, z.B. mit Wasser unter Bildung einer Hydroxyl-Gruppe stattfindet.

b. Theorien über die cytostatische Wirkungsweise von Endoxan.

Die cytostatische Wirkung von Endoxan wird hauptsächlich auf eine Alkylierung - besonders von Nucleinsäuren - und hier wieder besonders der DNA zurückgeführt. Ein gehöriges Maß an Verwirrung ist ganz offensichtlich, wenn man die Literatur durchsieht, da-

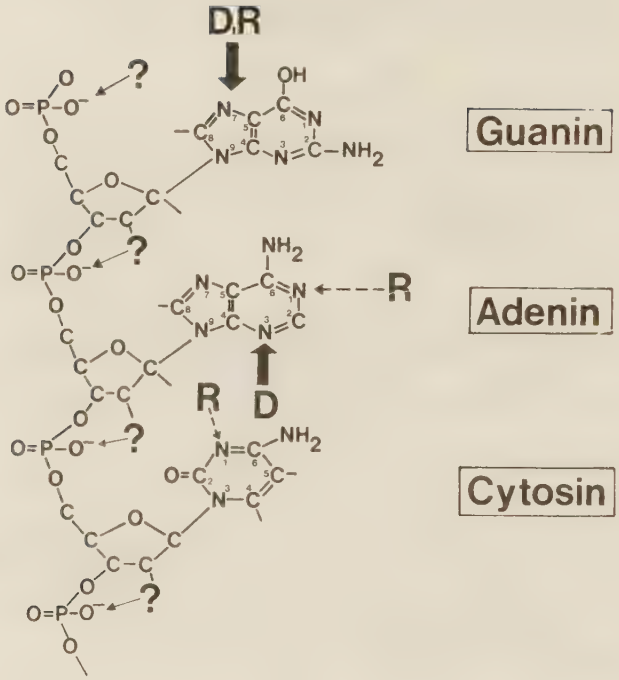


Abbildung 20:

Hauptangriffspunkte der Alkylierung der Nucleinsäure-Basen.
D = DNA; R = RNA. In der DNA wird etwa zu 70% N-7 von Guanin, zu 10% N-3 von Adenin alkyliert. Weiterhin kann eine Reaktion mit dem Sauerstoff des Phosphatrests diskutiert werden.

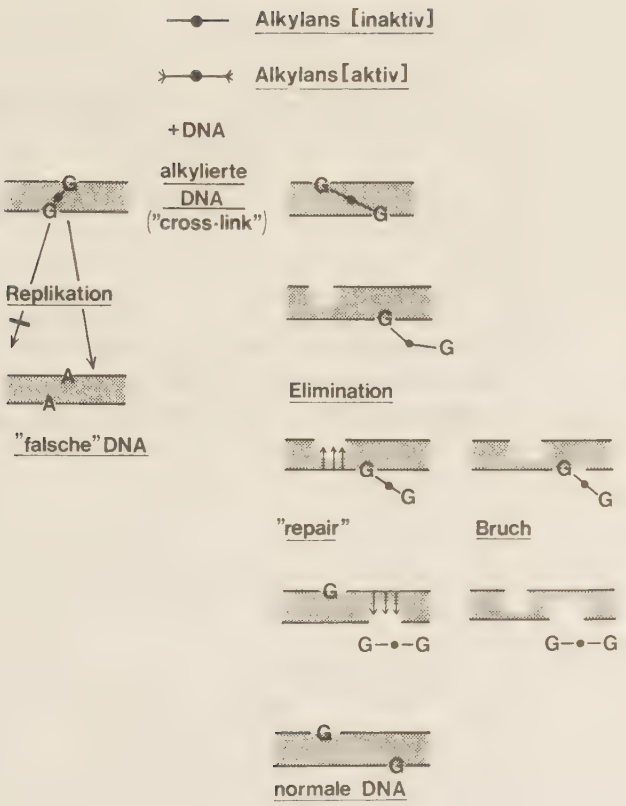


Abbildung 21:

Mechanismus der Alkylierung von DNA und Folgereaktionen

Die Verbindung, z.B. Endoxan, wird in die "aktive", alkylierende Form überführt. Es erfolgt eine monofunktionelle Reaktion oder eine Vernetzung ("cross-link").

Links: 1. Durch ausgeprägte Vernetzung wird eine regelrechte

Replikation verhindert.

2. Bei der nächsten Replikation wird die alkylierte Base falsch abgelesen (hier: es entsteht A statt C).

Rechts: 1. Eine alkylierte Base wird aus dem Polynucleotid herausgeborchen (Kettenbruch).

2. a) An dieser Stelle entsteht ein Ablesefehler oder

b) es kann ein Bruch der Doppelhelix resultieren.

c) Durch "repair" wird nach der Kopie des intakten Stranges die fehlende Base ergänzt: vollständige Restitution.

durch aufgetreten, daß Untersuchungen mit alkylierenden Substanzen, die in-vitro durchgeführt wurden, mit Versuchsergebnissen aus in-vivo-Versuchsanordnungen verglichen wurden. Es besteht kein Zweifel daran, daß durch Einwirkung entsprechend hoher Konzentrationen alkylierender Substanzen in-vitro eine Vielzahl von Alkylierungen nachgewiesen werden kann. Ob solche Alkylierungen - besonders auch in dem nach in-vitro-Versuchen vermuteten Ausmaß - bei Anwendung therapeutischer Dosen in-vivo auftreten, ist durchaus zweifelhaft. Die Situation wird außerdem dadurch kompliziert, daß nicht unbedingt vorausgesetzt werden kann, daß die Komponente, die am stärksten alkyliert wird, unbedingt das empfindlichste "target" in der Zelle darstellt. Es ist durchaus denkbar, daß für die biologische Wirkung besonders die Alkylierung einer Komponente ins Gewicht fällt, die mengenmäßig keine große Rolle spielt. Damit ist das Problem der biologischen Endoxan-Wirkung mit klassischen Methoden kaum zu lösen. (33, 35)

Untersuchungen besonders von BROOKES und LAWLEY haben ergeben, daß in den Nucleinsäuren - und vor allem in der DNA - die N-7-Position des Guanins und in geringerem Maße auch die N-3-Position des Adenins (siehe Abbildung 20) besonders leicht alkyliert werden. (15)

Prinzipiell ist vorstellbar, daß eine derartige Alkylierung von Nucleinsäuren - und besonders der DNA-Matrize - fünf verschiedene Veränderungen am DNA-Molekül hervorrufen kann (siehe Abbildung 21):

1. können polyfunktionelle Alkylantien eine Vernetzung ("crosslinking") der DNA-Stränge bewirken. Eine Lösung der Doppelhelix bei der Replikation oder bei der Transcription ist an diesen Stellen dann nicht mehr möglich.

2. können bei einem monofunktionellen Effekt Gruppen des Alkylans kovalent an die Base gebunden werden, so daß Ablesefehler erfolgen.

3. können bei monofunktioneller Wirkung bei einer Alkylierung der Base infolge von Verschiebungen der Elektronenverteilung die Bindungen zum Zucker gelockert werden, so daß die Base aus der Nucleinsäure entfernt wird. Dies geschieht besonders bei Purinen (Depurinisierung). Auch hier können Ablesefehler und damit Mutationen die Folge sein.

4. kann es durch weitere Labilisierung der Nucleinsäure-Grundstruktur zu Kettenbrüchen kommen.

5. können bei polyfunktionellen Alkylantien Vernetzungen zwischen verschiedenen Zellkomponenten vorkommen. Interessant sind in diesem Zusammenhang besonders Vernetzungen zwischen DNA-Strängen und anderen Zellkomponenten, z.B. Proteinen. Auch in diesem Fall kann eine Behinderung bei der Ablesung der DNA-Matrize auftreten.

Es ist zur Zeit nicht zu beurteilen, welche dieser Möglichkeiten die Hauptrolle bei der biologischen Wirkung alkylierender Verbindungen spielt, WHEELER (90) hat Argumente zusammengestellt, warum eine Alkylierung von Nucleinsäuren nicht unbedingt den Wirkungsmechanismus der Alkylantien darstellen muß. In diesem Zusammenhang sind ganz besonders Untersuchungen von LISS und PALME (51) interessant. Diese Autoren konnten zeigen, daß Veränderungen in der Fähigkeit zur Zellteilung bereits nach Anwendung von Dosen alkylierender Substanzen nachgewiesen werden können, bei denen eine Beeinträchtigung des DNA-Stoffwechsels nicht nachweisbar ist. Im Gegenteil nimmt der DNA-Gehalt der Zellen unter Umständen

sogar stärker zu als unter Normalbedingungen. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit Untersuchungen von HELGE und Mitarbeitern, der ebenfalls zeigen konnte, daß bei Tumoren kein Effekt auf die DNA-Synthese im Zellkern nachweisbar ist bei wirksamen Dosen des Cytostaticums. Hingegen konnte an mitochondrialer DNA eine deutliche Funktionsänderung festgestellt werden.

Obgleich zur Zeit noch weitgehende Unklarheit über die exakte Wirkungsweise dieser Gruppe cytostatisch wirksamer Substanzen besteht, erscheint es denkbar, daß entweder eine Beeinflußung cytoplasmatischer DNA oder aber ein Eingriff in Zellteilungsvorgänge direkt von entscheidender Bedeutung sind.

Beim Endoxan mit seiner phosphorhaltigen Seitenkette besteht zudem eine noch größere Unklarheit über die Wirkungsweise verglichen mit anderen Alkylantien, die lediglich alkylierende Gruppen aufweisen. Die Besonderheit der Wirkungsweise, die sich auch therapeutisch ganz klar demonstriert, könnte im Falle des Endoxans darin liegen, daß neben einer alkylierenden Wirkungsweise des Lost-Anteils noch eine weitere biologische Wirkung auftritt. In diesem Zusammenhang ist interessant, daß in der letzten Zeit postuliert wurde, daß während der Aktivierung des Endoxan-Moleküls Acrolein oder ein entsprechendes Derivat entstehen könnte, das mit für die biologische Wirkung verantwortlich wäre. Diese Hypothese erscheint uns besonders auch im Hinblick auf die embryotoxische Wirkung recht interessant. (26, 32 , 36, 44, 45, 50, 52, 78, 86)

c. Eigene Untersuchungen mit Endoxan

α) Übergang von Endoxan und Endoxan-Metaboliten vom

Muttertier auf den Embryo beziehungsweise Feten.

Uns interessierte zunächst die Frage, wieviel Endoxan nach Applikation an das Muttertier auf den Embryo beziehungsweise Feten übergeht. Die besonders ausgeprägte embryotoxische Wirkung könnte darin zu suchen sein, daß nicht nur eine besondere Empfindlichkeit des embryonalen Gewebes vorliegt, sondern daß auch im Embryo eine besonders hohe Konzentration des Pharmakons auftritt.

Die Untersuchungen wurden mit Tritium-markiertem Endoxan durchgeführt, das spezifisch in dem Lost-Anteil des Moleküls markiert war. Das ^{3}H-markierte Endoxan wurde uns freundlicherweise von Herrn Dozenten Dr. Schaumlöffel, Marburg, zur Verfügung gestellt. Wir wählten für unsere Untersuchungen den Zeitraum zwischen Tag 12 und 14 der Schwangerschaft, weil sich zu dieser Zeit die Organe entwickeln und man bei entsprechender Dosierung deutliche Effekte auf diese Organ-Determination - in Form von Mißbildungen - demonstrieren kann. Am Tag 11 der Schwangerschaft kann bei der Ratte eine embryotoxische Wirkung mit Dosen, die zwischen 5 und 10 mg/kg Endoxan liegen, hervorgerufen werden. Mit diesen niedrigen Dosen werden die Muttertiere praktisch nicht beeinflußt.

Bei dieser Versuchsanordnung interessierte uns vor allem die Gesamtmenge Endoxan, die im embryonalen Gewebe nachgewiesen werden kann. In Tabelle 8 ist daher die Gesamt-Radioaktivität pro Embryo angegeben sowie die dieser Radioaktivität entsprechende Menge Endoxan in ng. Nach Injektion von 1,4 mg Endoxan pro Muttertier (bei ca. 200 g Gewicht ≙ 7 mg/kg) werden nach 30 Min. 94 ng, nach 3 h 59 ng und nach 24 h 34 ng Endoxan in einem Embryo gefunden.

	0,5 Std	3 Std	24 Std
dpm/Embryo	$13,4 \times 10^4$	$8,3 \times 10^4$	$4,8 \times 10^4$
ng ENDOXAN/Embryo	94 (100%)	59 (63%)	34 (36%)
ng ENDOXAN/mg (feucht) Embryo ("mg/kg")	7,2 (100%)	3,9 (54%)	0,9 (13%)

Tabelle 8 : Aufnahme von Endoxan in embryonales Gewebe

Am Tag 12 der Schwangerschaft wurden 7 mg/kg Endoxan (0,14 mg/Tier) i.p. injiziert (spez. Akt. 400 mCi/mmol).
Die Werte geben die Gesamt-Radioaktivität an, die auf den Embryo übergegangen ist.

Die Menge der aus dem Endoxan stammenden Radioaktivität nimmt also im Embryo innerhalb von 24 Stunden auf etwa 1/3 ab. Eine noch ausgeprägtere Abnahme der Gesamt-Radioaktivität - nämlich auf etwa 13 % - wird beobachtet, wenn die gemessene Tritium-Menge nicht pro Embryo sondern pro mg Feuchtgewicht bezogen wird.

Ein solcher Bezug gibt eine ungefähre Übersicht über den Anteil der injizierten Endoxan-Dosis, der auf den Embryo übergeht: 7,2 ng/mg Feuchtgewicht würden 7,2 mg/kg entsprechen. Dies ist etwa die Menge von Endoxan, die dem Muttertier appliziert wurde. Diese Überschlagsrechnung zeigt, daß Endoxan im Embryo ganz sicher nicht angereichert wird. Bei einer gleichmäßigen Verteilung im Organismus - unter Abzug des Anteils des Körpergewichtes, der wahrscheinlich von der Verteilung ausgeschlossen ist, wie Knochen, Haare, Zähne usw. - würde man eher eine etwas höhere Konzentration als 7 mg/kg erwarten. In der Tat ist die Konzentration von Radioaktivität, die pro g Gewebe zum Beispiel im mütterlichen Gewebe gemessen werden kann, deutlich höher als im embryonalen Gewebe. Endoxan entfaltet also im embryonalen Gewebe eine ausgeprägte Wirkung, obgleich die Konzentration im Embryo sicher niedriger ist als die, die in vielen Organen des erwachsenen Organismus erreicht wird. Der embryotoxische Effekt beruht damit auf einer besonderen Empfindlichkeit des embryonalen Gewebes.

Für die beobachtete Abnahme der Endoxan-Radioaktivität im Embryo in Abhängigkeit von der Zeit nach der Injektion können drei Erklärungsmöglichkeiten herangezogen werden:

1. Beim embryonalen Gewebe handelt es sich um ein außerordentlich schnell wachsendes Gewebe, und in 24 Stunden hat die Größe des Embryos erheblich zugenommen.

in Fraktion:	% der Radioaktivität			
	mütterliche Leber		Embryo	
	24 h	48 h	24 h	48 h
säurelöslich	79	73	97	97
Lipide	4,4	4,9	0,8	1,3
RNA	1,0	1,6	0,3	0,3
sGG	11,4	14,7	0,8	0,5
DNA	<0,05	<0,05	<0,1	<0,1
Protein	4,1	5,9	1,1	1,0
Σ (dpm/µg DNA)	1257	912	342	268

Tabelle 9 : Prozentuale Verteilung der ^{3}H-Radioaktivität in verschiedenen Zellkomponenten der mütterlichen Leber und des embryonalen Gewebes nach Gabe von ^{3}H-Endoxan.

5 mg/kg ≙ 2 mCi/kg H-Endoxan wurden am Tage 12 der Schwangerschaft i.p. appliziert. Die Radioaktivität wurde 24 h später (Tag 13 der Schwangerschaft) bzw 48 h später (Tag 14 der Schwangerschaft) bestimmt.

In der hier untersuchten Phase der Embryonalentwicklung beträgt der Faktor für die Größenzunahme etwa 3. Die Radioaktivität in einer Zellkomponente nach einer Alkylierung wird daher - auf mg Feuchtgewicht bezogen - abnehmen, weil in 24 Stunden eine erhebliche Menge von nicht-radioaktiv-markierter Komponente neugebildet wurde und der radioaktiv markierte Anteil dadurch entsprechend "verdünnt" wird. Daß diese Überlegung zutrifft, zeigen die in der Tabelle 8 wiedergegebenen Daten. Die Abnahme der Radioaktivität (ng Endoxan)/Embryo ist wesentlich geringer (36 %) als die Abnahme bezogen auf mg Feuchtgewicht des Embryos (13 %). Der Unterschied zwischen den beiden Prozentzahlen entspricht genau dem Wachstumsfaktor.

2. Die Abnahme der Radioaktivität/Embryo zeigt jedoch, daß auch absolut die Menge Radioaktivität, die nach einer halben Stunde auf den Embryo übergegangen ist, im Laufe der Zeit abnimmt (auf 1/3). Eine Erklärung für dieses Phänomen können die in der Tabelle 9 wiedergegebenen Ergebnisse geben. In den Versuchen, deren Ergebnisse hier zusammengestellt sind, wurde die prozentuale Verteilung der ^{3}H-Radioaktivität auf verschiedene Zellkomponenten der mütterlichen Leber und des embryonalen Gewebes untersucht. Für diese Untersuchungen wurde eine modifizierte OGUR-ROSEN/SCHMIDT-TANNHAUSER-Technik (Säure-Laugen-Fraktionierung) benutzt, wie sie von Krowke (48,49) in unserer Arbeitsgruppe angegeben wurde. Aus den Daten der Tabelle 9 ist klar zu ersehen, daß nach 24 h und selbst nach 48 h der Hauptteil der Radioaktivität in kleinmolekularer, säurelöslicher Form vorliegt. Lipide und Makromoleküle enthalten insgesamt nur 3 % der im Embryo gefundenen Radioaktivität. Auch in der mütterlichen Leber ist 24 h und 48 h nach der Injektion der überwiegende Anteil der Radioaktivität

in säurelöslicher Form vorhanden. (59, 71, 82)

Die Abnahme der Endoxan-Radioaktivität innerhalb der ersten 24 Stunden betrifft daher im wesentlichen die kleinmolekularen, säurelöslichen Komponenten, während die Radioaktivität in den alkylierten Makromolekülen vergleichsweise wenig zu dieser Verminderung beiträgt. Während des Eliminationsvorganges des Endoxans und der damit verbundenen Verminderung der Endoxan-Menge im mütterlichen Serum strömt offenbar ein nicht unerheblicher Teil der ursprünglich im Embryo lokalisierten Radioaktivität in den mütterlichern Organismus zurück und wird ausgeschieden.

3. Eine weitere Erklärungsmöglichkeit für die Abnahme der Endoxan-Radioaktivität im Embryo könnte darin zu suchen sein, daß der Organismus in der Lage ist, entstandene Schäden zu reparieren und damit Alkylreste zu entfernen ("repair"-Mechanismus). Solche repair-Mechanismen sind nach Einwirkung alkylierender Substanzen besonders bei Mikroorganismen in erheblichem Umfange vorhanden. Diese Frage ist bei Alkylierungen von Säugetiergeweben sehr viel schlechter untersucht. Orientierende Untersuchungen, die von uns nach ^{3}H-Endoxan-Gabe durchgeführt wurden, ergaben jedoch überraschenderweise, daß mindestens im Embryo eine solche Eliminierung im Laufe von mehreren Tagen kaum stattfindet. Auch nach Injektion von nicht oder nur verhältnismäßig geringfügig embryotoxischen Dosen von ^{3}H-Endoxan findet bei Berücksichtigung des Wachstums der Embryonen keine Verringerung oder gar Eliminierung der radioaktiven Markierung nach 48 Stunden mehr statt. Da unsere Ergebnisse gezeigt haben, daß sich der Organismus ohne wesentliche erkennbare Schäden weiterentwickelt - die Wachstumsgeschwindigkeit ist kaum verändert - ist dieser Befund schwer verständlich. Es könnte sein, daß Zellen mit einem hochgradigen Alkylierungs-Defekt zunächst von der Zellteilung ausgeschlossen

sind, aber nicht gleich absterben und eliminiert werden. Damit würde die im gesamten Embryo meßbare Radioaktivität zunächst konstant bleiben.

Wir können jedoch zur Zeit leider eine weitere Möglichkeit nicht vollkommen ausschließen: Es ist denkbar, daß aus dem Tritium-markierten Endoxan im Organismus Tritium-Wasser gebildet wird, das auf den Embryo übergeht oder dort entsteht. Solches Tritium-haltige Wasser würde sicher sehr lange im Organismus verbleiben. Es ist dies ein Nachteil aller biologischen Versuche, die mit Tritium-markierten Verbindungen durchgeführt werden, und unsere Arbeitsgruppe hat insgesamt schlechte Erfahrungen bei derartigen biologischen Versuchen mit tritierten Verbindungen gemacht. Wir haben damit begonnen, die hier geschilderten Experimente mit ^{14}C-markierten Substanzen zu wiederholen. Solche Untersuchungen scheitern zunächst an dem sehr viel größeren Preis ^{14}C-markierter Verbindungen. Es erscheint uns daher gerechtfertigt, zunächst orientierende Experimente mit tritierten Verbindungen durchzuführen und dann gezielte Experimente mit ^{14}C-Verbindungen anzustellen.

β) Alkylierungsrate von Kern- beziehungsweise Mitochondrien-DNA (Untersuchungen mit ^{3}H-Endoxan).

Besonders interessierte uns die Frage, wie hoch die DNA im embryonalen Gewebe unter Bedingungen in-vivo alkyliert wird. Für diese Untersuchungen wurde die DNA nach Gabe von Tritium-markiertem Endoxan in jedem Fall nach der Phenol-Methode isoliert und die hochgereinigte DNA untersucht. Voruntersuchungen haben ergeben, daß die Säure-Basen-Fraktionierung für solche Untersuchungen ungeeignet ist - besonders bei Anwendung von ^{3}H-Endoxan. Die Menge der hochgereinigten DNA wurde entweder nach der BURTON-

Tabelle 10 : Kalkulation der Alkylierungsrate in der DNA nach Gabe von 7 mg/kg Endoxan (nach 3 Stunden) Größen, die zur Berechnung in der Tabelle 11 benutzt wurden.

gegeben:

spez. Akt. Endoxan = 400 µCi/mg
= 104 µCi/µmol
1 dpm Endoxan ≙ 0,0043 pmole Endoxan
1 pg DNA = 0,00306 pmole DNA-Nucleotide
($\overline{M}$ = 327)

Voraussetzungen:

1 pg DNA ≙ $1{,}8 \times 10^{9}$ Nucleotide
1 pmol DNA-Nucleotide ≙ 6×10^{11} Nucleotide

1 Leber-Zellkern = im Mittel 7 pg DNA
1 Embryo-Zellkern = im Mittel 13 pg DNA

	LEBER		14-TAGE EMBRYONEN	
	Zellkerne	Mitochondrien	Zellkerne	Mitochondrien
dpm (Endoxan)/µg DNA	0,2	50	0,2	74
" /pg DNA	$0{,}2 \times 10^{-6}$	50×10^{-6}	$0{,}2 \times 10^{-6}$	74×10^{-6}
p mole Endoxan/	$8{,}7 \times 10^{-10}$	$2{,}2 \times 10^{-7}$	$8{,}7 \times 10^{-10}$	$3{,}2 \times 10^{-7}$
" /p mole DNA-Nucleotide	$2{,}8 \times 10^{-7}$	7×10^{-5}	$2{,}8 \times 10^{-7}$	1×10^{-4}
d.h. 1 p mol Endoxan/x p mole DNA-Nucleotide	$3{,}5 \times 10^{6}$	$1{,}4 \times 10^{4}$	$3{,}5 \times 10^{6}$	$9{,}6 \times 10^{3}$
p mole DNA-Nucleotide/Zelle (Mittel)	$2{,}1 \times 10^{-2}$	$3{,}1 \times 10^{-4}$	4×10^{-2}	8×10^{-5}
Zahl der DNA-Nucleotide/Zelle (Mittel)	$1{,}3 \times 10^{10}$	$1{,}8 \times 10^{8}$	$2{,}4 \times 10^{10}$	$4{,}8 \times 10^{7}$
Alkylierungen/Zelle (Mittel)	$3{,}7 \times 10^{3}$	$1{,}3 \times 10^{4}$	$6{,}9 \times 10^{3}$	5×10^{3}
% der Alkylierungen/Zellkomponente (Kerne + Mitochondrien = 100%)	22%	78%	58%	42%

Tabelle 11: Kalkulation des Alkylierungsgrades in der DNA nach Gabe von 7 mg/kg Endoxan (3 Stunden nach Injektion)

Methode bestimmt oder durch Messung der Extinktion bei 260 nm. Die Ergebnisse einiger typischer Versuche sind in Tabelle 11 wiedergegeben. Auffällig ist, daß mitochondriale DNA zwei bis drei Zehnerpotenzen höher markiert ist als Zellkern-DNA. Dies gilt sowohl für embryonales als auch für mütterliches Lebergewebe. Ähnliche Resultate wurden bereits in Zusammenarbeit mit HELGE an Tumorgeweben erhoben. (24, 34, 35)

Interessant ist, daß die Alkylierung mitochondrialer DNA sowohl in den Geweben erwachsener Organismen als auch in Tumoren und Embryonen hoch ist, obgleich das kaum proliferierende Lebergewebe verhältnismäßig unempfindlich gegenüber alkylierenden Substanzen ist. Falls der hohen Alkylierung mitochondrialer DNA eine Bedeutung bei der Endoxan-Wirkung zukommt, kann nicht das Ausmaß der Alkylierung entscheidend sein sondern der jeweilige Funktionszustand des Gewebes. Bei gleichstarker Alkylierung müßte das nicht proliferierende Lebergewebe weniger in seinem Stoffwechsel beeinflußt sein als schnell wachsende Gewebe.

Wir haben weiterhin Berechnungen durchgeführt über die mittlere Häufigkeit der Alkylierung in den verschiedenen DNA- Spezies sowie Berechnungen über die Verteilung der DNA-Alkylierung innerhalb der Zelle. Die Ergebnisse solcher Berechnungen sind in den Tabellen wiedergegeben.

Unter unseren Versuchsbedingungen entspricht ein dpm = 0,0043 pmol Endoxan.

Die zu der Berechnung gemachten Voraussetzungen sind in der Tabelle 10 zusammengestellt. Die Kalkulation der Tabelle 11 zeigt, daß in den Leberzellkernen eine Alkylierung auf 3,5 Millionen DNA-Nucleotide kommt. Eine

Gewebe	µg DNA /mg Mito.-Prot.	Cyt. ox. /mg Mito.-Prot.	Cyt. ox. /µg DNA (Homogenat)	µg Mito.-DNA /µg Gesamt-DNA	%	pg DNA Zellkern /pg DNA Mito.
Ratten-leber	0,5 ± 0,15	350	10	0,014	1,4	7 0,1
14-Tage Embryo	2,0	1200	1	0,002	0,2	13,0 0,03

Tabelle 12: Berechnung der Menge Mitochondrien-DNA pro Zelle
Cytochromoxydase-Aktivität wurde als gemeinsame Größe zur Berechnung des Mitochondrien-DNA-Anteils von Gesamt-DNA-Gehalt der Zelle benutzt.

etwa gleiche Zahl ergibt sich für die DNA aus Zellkernen der Embryonen. In den Mitochondrien kommt eine Alkylierung auf etwa jedes 1o.oooste DNA-Nucleotid.

Die Menge Mitochondrien-DNA pro Zelle ist nur schwer zu bestimmen. Wir haben uns bei der Berechnung eines Hilfsmittels bedient und den DNA-Gehalt in weitgehend reinen Mitochondrien-Suspensionen bestimmt. Durch Benutzung eines gemeinsamen Bezugssystems - Cytochromoxydase - das nur in Mitochondrien lokalisiert ist, gelingt ein Bezug auf den Gesamt-DNA-Gehalt der Zelle. Auf diese Weise kann der Prozentsatz der Mitochondrien-DNA von der Gesamt-DNA der Zelle berechnet werden. Es ergibt sich, daß in der Rattenleber etwa 1 % der Zell-DNA in den Mitochondrien lokalisiert ist. Bei 14-Tage-alten Rattenembryonen ist dieser Prozentsatz sehr viel niedriger - nämlich o,2 % - obgleich der DNA-Gehalt pro mg Mitochondrien-Protein deutlich höher liegt als bei Leber-Mitochondrien. Dieses Resultat kommt dadurch zustande, daß die Zellen des Embryos offenbar nur wenige Mitochondrien enthalten. (Tab. 12)

Auf diese Weise ist es möglich, die mittlere absolute Anzahl der DNA-Nucleotide pro Zelle zu berechnen. Nach Festlegung dieser Größen kann eine Kalkulation der mittleren Alkylierungsrate pro Zelle in mütterlichem Lebergewebe und im embryonalen Gewebe durchgeführt werden. Es ergibt sich, daß sowohl in Leber als auch im Embryo etwa 5.ooo Alkylierungen pro Zellkern auftreten. In der Gesamtheit der Leber-Mitochondrien einer Zelle wird diese Zahl sogar noch deutlich überschritten. Die Berechnung zeigt, daß in den embryonalen Zellen annähernd die Hälfte der DNA-Alkylierungen im Zellkern sowie in den Mitochondrien auftreten. In der mütterlichen Leberzelle sind nur etwa 2o % der Alkylierungen der DNA im Zellkern zu lokalisieren, während nahezu 8o % auf Alkylierungen von Mitochondrien-DNA fallen.

Man kann diese Kalkulationen - die natürlich nur grobe Anhaltswerte liefern können - noch etwas weitertreiben. Da bekannt ist, daß eine Leberzelle im Durchschnitt etwa 1.ooo Mitochondrien enthält, würden die DNA eines Mitochondrions etwa 1o Alkylierungen treffen. Wenn man pro Mitochondrion im Durchschnitt vier DNA-Fäden annimmt, so wären das etwa drei Alkylierungen pro DNA-Molekül.

Bei all diesen Kalkulationen ist nicht berücksichtigt, ob es sich um monofunktionelle Alkylierungen oder um Vernetzungen handelt. Desgleichen beruhen alle diese Berechnungen auf der Voraussetzung, daß die im DNA-Molekül gemessene Radioaktivität von einer Alkylierung herrührt.

Zur Zeit ist es nicht möglich zu entscheiden, welche Bedeutung eine vergleichsweise ausgeprägte Alkylierung von Mitochondrien-DNA bei der Wirkungsweise des Endoxans spielen könnte. Wir haben vor, die hier geschilderten Experimente mit ^{14}C-markiertem Endoxan zu vervollständigen.

γ) "Vernetzung" von DNA- und Proteinkomponenten

Wie bereits erwähnt besteht nicht nur die Möglichkeit, daß DNA-Stränge nach Einwirkung alkylierender Substanzen vernetzt werden, sondern es ist auch eine Vernetzung eines DNA-Stranges mit anderen Zellkomponenten denkbar. Besonders von GRUNICKE (94) wurde die Möglichkeit eines "crosslinking" von DNA mit Protein-Strängen unter der Wirkung von Trenimon diskutiert und als mögliche Ursache der biologischen Wirkung von alkylierenden Substanzen interpretiert.

Da die Protein-Anteile der Zellen nach Einwirkung von ^{3}H-Endoxan in unseren Versuchen sehr viel höher markiert gefunden wurden als die entsprechende DNA-Fraktion, wäre

Gewebe	^{3}H-markierte Aminosäure	Endoxan	Zellkern-DNA [dpm/µg DNA]	M-DNA [dpm/µg DNA]	Gesamt Zell-Proteine dpm/µg Protein
LEBER					
	Leucin		o,6 ± o,o4	o,5	19,5 ± 1,7
	Leucin	+	2,2 ± o,2	< o,1	3o,5 ± 2,8
	Lysin		2,4 ± o,2	< o,1	42,2 ± 3,8
	Lysin	+	4,1 ± o,3	o,1	52,3 ± 4,2
	Asparaginsäure		o,6 ± o,o8	< o,1	o,9 ± o,1
	Asparaginsäure	+	o,9 ± o,1	< o,1	1,2 ± o,1
TESTES					
	Leucin		o,3 ± o,o5		12,6 ± 1,o
	Leucin	+	o,2 ± o,o4		1o,6 ± 1,4
	Lysin		o,5 ± o,o3		2o,4 ± 1,8
	Lysin	+	1,o ± o,o8		16,9 ± 1,5
	Asparaginsäure		o,1 ± o,o3		o,6 ± o,o4
	Asparaginsäure	+	o,1 ± o,o2		o,4 ± o,o4

Tabelle 13: Bestimmung des Restproteingehalts hochgereinigter Zellkern- und Mitochondrien-DNA nach Gabe von Tritium-markierten Aminosäuren. Zum Vergleich ist die spez. Radioaktivität der Proteine angegeben.

Dosierung der Aminosäuren: 5 mCi/kg (Asp. = 232 mCi/mM
Leu. = 1.ooo mCi/mM
Lys. = 197 mCi/mM)

Dosierung des Endoxans: 1oo mg/kg

Das Endoxan wurde 4 h vor den Aminosäuren i.p. injiziert; die Injektion der Aminosäuren erfolgte s.c.. 24 h später wurden die Tiere getötet und die entsprechenden Gewebefraktionen hochgereinigt isoliert. Die Isolierung der DNA erfolgte nach den modifizierten MARMUR-Verfahren; die Proteine wurden nach Extraktion der übrigen Zellkern- bzw. Mitochondrienkomponenten nach OGUR-ROSEN in 2o %iger NaOH gelöst.

es denkbar, daß über eine Diäthylamin-Brücke kleine Protein-Fragmente mit hochgradiger Alkylierung an die DNA-Stränge angeheftet sind und diese Gruppen auch bei der Reinigung der DNA in der DNA-Fraktion verbleiben. Dies könnte eine hohe Alkylierungsrate der DNA vortäuschen. Zur Klärung dieser Frage haben wir folgende Versuchsanordnung gewählt: Tritium-markierte Aminosäuren, Leucin, Lysin und Asparagin-Säure - das heißt, eine neutrale, eine basische und eine saure Aminosäure - wurden Ratten subcutan injiziert, um die Zellproteine radioaktiv zu markieren. Es wurden dann die Kern-DNA und Mitochondrien-DNA isoliert und nach dem üblichen Verfahren hochgereinigt. Die Bestimmung der Radioaktivität in den verschiedenen DNA-Fraktionen erlaubte dann Rückschlüsse auf den Gehalt an Protein-Fragmenten in dieser DNA. Da bei den bisher erwähnten Versuchen zwischen embryonalen Geweben und Geweben erwachsener Organismen kein prinzipieller Unterschied festgestellt werden konnte, beschränkten wir diese Untersuchungen auf einige erwachsene Gewebe. Zellkern-DNA und Mitochondrien-DNA wurde aus den Lebern isoliert bei Tieren, die mit Endoxan vorbehandelt wurden und bei Kontrollen. Als schneller proliferierendes Gewebe wurde außerdem noch Testes-Gewebe untersucht. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind in der Tabelle 13 wiedergegeben.

Die Markierung der Proteine in Leber und in Testes war nach Gabe von Lysin am höchsten und besonders niedrig nach Gabe von ^{3}H-Asparaginsäure. In der Kern-DNA aus Lebergewebe konnte nach Gabe aller drei Aminosäuren unter dem Einfluß von Endoxan eine signifikante Vermehrung des Gehaltes an tritierten Aminosäuren nachgewiesen werden. Die Menge der in der Kern-DNA-Fraktion der Leber nach Endoxan-Behandlung nachgewiesenen radioaktiven Aminosäuren war gegenüber Kontrollen etwa verdoppelt. Ob dieser Vermehrung der in der DNA-Fraktion gefundenen

Aminosäuren eine Bedeutung bei der biologischen Wirkung des Endoxans zukommt, kann zur Zeit nicht entschieden werden. Bei dem von uns ebenfalls untersuchten Testes-Gewebe wird eine Anreicherung der Aminosäuren in der Kern-DNA-Fraktion nur nach Markierung mit Lysin gefunden. Auch hier ergibt sich bei behandelten Tieren wieder ein etwa doppelt so hoher Wert wie bei Kontrollen. Hingegen konnte mit den Aminosäuren Leucin und Asparaginsäure keine signifikante Differenz nachgewiesen werden.

Interessanterweise war der Gehalt an Proteinen in der Mitochondrien-DNA-Fraktion aus Lebergewebe ein bis zwei Zehnerpotenzen niedriger als in den entsprechenden Kern-DNA-Fraktionen. Dies ist umso bemerkenswerter, als eine Reindarstellung der Mitochondrien-DNA sehr viel schwieriger ist als die Gewinnung von weitgehend Protein-freier Kern-DNA. Andererseits ist bekannt, daß Mitochondrien-DNA keine Begleitproteine - zum Beispiel Histone - besitzt. Sie wird als "nackt" angesehen. Der niedrige Gehalt an Aminosäuren in der Mitochondrien-DNA-Fraktion konnte bei Anwendung aller drei Aminosäuren festgestellt werden. Nach Behandlung mit Endoxan war im Falle der Mitochondrien-DNA in keinem Fall ein signifikanter Anstieg des Protein-Anteils nachzuweisen. Diese Ergebnisse schliessen weitgehend aus, daß die hohe Alkylierungsrate, die wir bei mitochondrialer DNA gefunden haben, durch angeheftete, hochalkylierte Protein-Fragmente vorgetäuscht sein kann. Die Ergebnisse sprechen dafür, daß tatsächlich eine direkte Alkylierung der Mitochondrien-DNA stattgefunden hat.

Es mag noch erwähnt werden, daß die hier geschilderten Experimente mit der außerordentlich hohen Dosis von 1oo mg/kg Endoxan durchgeführt wurden. Die Anwendung so hoher Endoxan-Dosen ist möglich, wenn nur die Gewebe eines erwachsenen Organismus untersucht werden. Es

Gewebefraktion	Endoxan	DNA extrahiert nach OGUR-ROSEN	Isolierte DNA
		dpm (^{3}H-Tdr eingebaut)/µg DNA	
Leberkerne	---	425 ± 39	469 ± 32
	15 mg/kg	473 ± 38	492 ± 40
Embryo-Kerne	---	703 ± 62	772 ± 75
	15 mg/kg	638 ± 60	680 ± 42
Leber-Mitochondrien	---	1.460 ± 158	
	15 mg/kg	914 ± 112	
Embryo-Mitochondrien	---	564 ± 60	
	5 mg/kg	501 ± 28	
	15 mg/kg	292 ± 28	

Tabelle 14: Einbau von ^{3}H-Thymidin in embryonale und Leber-Kern- und Mitochondrien-DNA mit und ohne Endoxanvorbehandlung.
Das Endoxan wurde am Tag 13 der Schwangerschaft um 18.oo Uhr i.p. injiziert; 18, 21 und 24 h später wurde je 1 mCi/kg ^{3}H-Thymidin (Σ = 3 mCi/kg) ebenfalls i.p. injiziert; am folgenden Tag (Tag 15 der Schwangerschaft) wurden die Lebern und Embryonen isoliert und daraus 5 x gewaschene Rohkerne und Gradienten-Mitochondrien gewonnen.

erscheint demnach recht zweifelhaft, ob bei Anwendung entsprechend geringerer Dosen - embryotoxische und cytostatische Effekte werden bereits mit Dosen, die eine Zehnerpotenz niedriger liegen erreicht - selbst in der Kern-DNA noch eine signifikante Vermehrung des Gehaltes an Protein-Fragmenten nachweisbar ist. Alkylierungen zwischen DNA und Proteinen scheinen daher bei Anwendung therapeutischer Dosen - 1o bis 2o mg/kg - eine untergeordnete Rolle zu spielen.

δ) Aktivität der mitochondrialen DNA-Polymerase nach Einwirkung von Endoxan.

Um den Einfluß von Endoxan auf die DNA-Synthese in Zellkernen und Mitochondrien in-vivo näher zu analysieren, wurden zwei verschiedene Versuchsanordnungen gewählt:

I. Nach Vorbehandlung mit Endoxan (nicht-radioaktiv) wurde Tritium-markiertes Thymidin injiziert und der Einbau in Zellkern-DNA und in mitochondriale DNA untersucht. Im Falle der Zellkern-DNA wurden zwei verschiedene Methoden - Säure-Basen-Fraktionierung und Phenolextraktion - verglichen.

II. Außerdem wurden aus Endoxan-vorbehandelten Tieren und von Kontrollen mitochondriale DNA-Polymerase sowie mitochondriale DNA und Zellkern-DNA isoliert und in-vitro im "Kreuzversuch" ausgetestet.

I. Die in Tabelle 14 zusammengestellten Werte geben die Ergebnisse von Versuchen wieder, in denen der Einbau von ^{3}H-Thymidin in Zellkern-DNA und mitochondrialer DNA von mütterlichem Lebergewebe und von

Embryonen untersucht wurde. Während der Thymidin-Einbau in die Leberkern-DNA eher leicht gesteigert ist, ist der Einbau in die Embryo-Kern-DNA unter der Wirkung von 5 mg/kg Endoxan unverändert oder geringfügig erniedrigt. Die mit zwei verschiedenen Methoden - Säure-Laugen-Fraktionierung und Phenol-extraktion - gewonnenen Ergebnisse stimmen gut überein.

Etwas auffallend ist der geringe Unterschied in der Markierung der Zellkern-DNA von Lebern und von Embryonen, da man bei dem erheblichen Unterschied der Mitose-Häufigkeit in beiden Geweben deutlichere Unterschiede erwarten würde. Drei Erklärungen bieten sich hierfür an: Einmal geht Thymidin offenbar - besonders bei i.p. Injektion - verhältnismäßig schlecht auf den Embryo über. Zweitens wurden die drei Thymidin-Injektionen nachmittags bis abends verabfolgt. In der Leber sind jedoch erhebliche tageszeitliche Schwankungen der Thymidin-Einbaurate bekannt mit einem Maximum der Einbaurate in den Abendstunden. Und drittens wurde der Einbau 24 Stunden nach der letzten Thymidin-Injektion untersucht, so daß die spezifische Aktivität in den Embryo-Kernen durch neugebildete, nicht-markierte DNA "verdünnt" wurde.

Im Gegensatz zur DNA in Zellkernen wird der Einbau von Thymidin in die mitochondriale DNA sowohl von adultem Lebergewebe als auch von Embryonen durch eine Endoxan-Behandlung deutlich erniedrigt. Ein ausgeprägter Effekt ist mit 15 mg/kg nachzuweisen. Die Wirkung ist bei Embryo-Mitochondrien ausgeprägter als bei Leber-Mitochondrien. Mit 5 mg/kg - einer noch nicht embryotoxischen Dosis - ist noch kein signifikanter Unterschied zu beobachten.

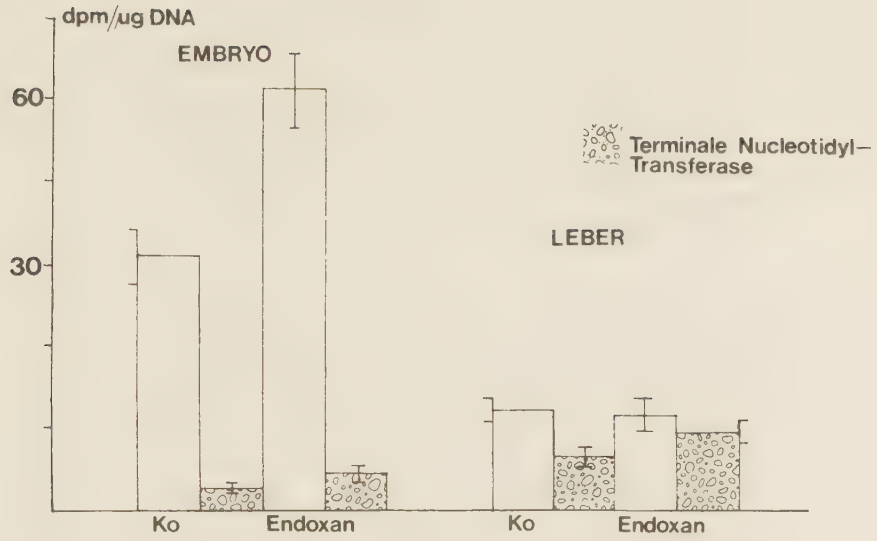


Abbildung 22:

Vergleich der DNA-Polymerase in den Zellkernen von Rattenlebern und in Rattenembryonen am Tag 13 der Schwangerschaft.

Diese Untersuchungen bestätigen Ergebnisse, die von NEUBERT und HELGE und NEUBERT für Lebergewebe bereits früher publiziert wurden. Sie stimmen ebenfalls weitgehend mit Ergebnissen überein, die von diesen Autoren in Tumoregeweben erhalten wurden. Auch an den Mitochondrien aus Tumoren konnte durch Endoxan-Vorbehandlung eine wesentliche Verminderung des Thymidin-Einbaues hervorgerufen werden bei gleichzeitig sehr viel geringerem Effekt auf den Thymidin-Einbau in Leber-Mitochondrien. Alle diese Ergebnisse passen relativ gut zu dem Befund, daß Mitochondrien-DNA weitaus stärker alkyliert wird als Zellkern-DNA.

II. Um Aussagen darüber machen zu können, ob die Hemmung des Thymidin-Einbaues wirklich auf der Stufe der DNA-Synthese stattfindet oder ob es sich lediglich um Sekundäreffekte handelt, - beispielsweise hervorgerufen durch eine Veränderung der Thymidinkinase-Aktivität - wurden die DNA-Polymerase-Reaktionen nach Einwirkung von Endoxan untersucht.

Wird die DNA-Polymerase in isolierten, intakten Zellkernen 24 Stunden nach Gabe von 10 mg/kg Endoxan untersucht, so ergibt sich bei Kernen aus Embryonen eine deutliche Erhöhung der Reaktion gegenüber Zellkernen aus Kontroll-Embryonen. Dieser Befund entspricht Ergebnissen von NEUBERT und KÖHLER (69). Von diesen Autoren wurde dieser Effekt als "Retardierung" interpretiert. Die in Abbildung 22 wiedergegebenen Ergebnisse zeigen, daß unter unseren Versuchsbedingungen die DNA-Polymerase-Reaktion in Embryo-Kernen weitgehend frei von der terminalen Reaktion gemessen wird.

Besonders eingehend haben wir daraufhin den Einfluß der Alkylierung auf das Ferment-Protein sowie auf die verschiedenen DNA-Spezies in "Kreuzversuchen" unter-

Vorbehandlung mit Endoxan mg/kg		DNA-Polymerase		50 µg DNA / 10 µg DNA	terminale Transferase	% der DNA-Polymerase-Aktivität
Enzym	DNA	+ 10 µg Kern-DNA	+ 50 µg Kern-DNA		(50 µg Kern-DNA)	
Ø	Ø	14 ± 1,5	26 ± 2,2	1,9	4	15%
Ø	50	18 ± 1,5	26 ± 1,8	1,5	4	15%
Ø	200	19 ± 1,3	27 ± 1,7	1,4	4	15%
50	Ø	20 ± 1,8	36 ± 3,0	1,8	5	14%
50	50	24 ± 1,8	35 ± 3,1	1,5	6	17%
50	200	26 ± 2,2	37 ± 3,3	1,5	6	16%
200	Ø	13 ± 1,1	23 ± 1,8	1,8	4	17%
200	50	16 ± 1,4	26 ± 2,4	1,6	4	15%
200	200	18 ± 1,8	25 ± 2,3	1,4	4	16%

Tabelle 15: Untersuchung des Einflusses von Endoxan auf DNA-Polymerase aus Mitochondrien unter Verwendung von DNA aus Zellkernen (Rattenleber)
Das Endoxan wurde 24 Stunden vor der Isolierung der Zellpartikel i.p. injiziert. Enzymatischer Versuchsansatz siehe Kapitel "Methodik".

Vorbehandlung mit Endoxan [mg/kg]		DNA-Polymerase-Aktivität (+ 10 µg M-DNA)
Enzym	DNA	[dpm/µg Protein]
Ø	Ø	14 ± 0,9
Ø	50	14 ± 1,0
Ø	200	16 ± 1,2
50	Ø	17 ± 1,5
50	50	16 ± 1,3
50	200	17 ± 1,5

Tabelle 16: Untersuchung des Einflusses von Endoxan auf DNA und DNA-Polymerase aus Rattenlebermitochondrien.

Das Endoxan wurde 24 Stunden vor der Isolierung der Mitochondrien i.p. injiziert. Zur Isolierung von Enzymfraktion und DNA wurden "Gradientenmitochondrien" verwandt. Der enzymatische Versuchsansatz ist ausführlich im Kapitel "Methodik" beschrieben worden.

sucht. Leider konnten derartige Untersuchungen bisher nur mit Lebergewebe durchgeführt werden, da eine entsprechende Menge von mitochondrialer DNA-Polymerase aus Embryonen nicht gewonnen werden konnte. DNA-Polymerase aus den Mitochondrien von Kontrolltieren oder von Endoxan-behandelten Tieren wurde in diesen Versuchsserien jeweils mit DNA als Matrize ausgetestet, die ebenfalls entweder von Kontrolltieren stammte (Kern-DNA und Mitochondrien-DNA) oder von Endoxan-behandelten Tieren. Die Ergebnisdieser Versuche mit Zellkern-DNA sowie mit Mitochondrien-DNA sind in den Tabellen 15 und 16 zusammengestellt.

Besonders bei Verwendung von mitochondrialer DNA (Tabelle 16) fällt auf, daß die Matrizen-Eigenschaft durch Vorbehandlung - selbst mit höchsten Dosen - von Endoxan praktisch nicht vermindert wird. Dieser Befund ist zunächst überraschend, könnte jedoch eventuell damit erklärt werden, daß DNA-Polymerase aus Rattenleber-Mitochondrien nicht unbedingt das günstigste Versuchsobjekt darstellt - gemessen an der Ablesung nativer DNA - wie aus den in Abschnitt 1. wiedergegebenen Resultaten zu schließen ist. Bei Verwendung von Zellkern-DNA als Matrize ist die DNA-Polymerase-Reaktion bei Verwendung von alkylierter DNA deutlich erhöht. Die Versuche, die mit verschiedenen Mengen von DNA durchgeführt wurden, zeigen jedoch, daß nur die Sättigung mit DNA schneller erreicht wird, während bei Verwendung von DNA-Mengen im Sättigungsbereich kein Unterschied zwischen normaler DNA und alkylierter DNA gefunden wird. Besonders nach Gabe von relativ geringen Endoxan-Dosen (5o mg/kg) scheint die Ausbeute an mitochondrialer DNA-Polymerase oder die Aktivität bezogen auf Mitochondrien-Protein erhöht zu sein. Dieser

Effekt tritt bei Verwendung von 2oo mg/kg Endoxan nicht mehr auf.

Diese Ergebnisse ergeben - mindestens bei Verwendung von Mitochondrien-DNA-Polymerase aus Rattenleber - keinen Anhalt dafür, daß eine hochgradig alkylierte DNA eine schlechtere Matrizen-Funktion besitzt als DNA, die aus Kontrolltieren isoliert wurde. Die hier verwendeten DNA-Fraktionen wurden allerdings nicht im Saccharose-Gradienten gereinigt, so daß eine Erhöhung von DNA-se-Aktivitäten und eine damit verbundene Verbesserung der "primer"-Eigenschaften zur Zeit nicht ausgeschlossen werden kann. Wir haben vor, die hier geschilderten Versuchsserien mit Mäuseembryonen zu wiederholen, die nach unseren jetzigen Erfahrungen unter Umständen ein günstigeres Test-System abgeben.

ε) Modifizierung der embryotoxischen Wirkung von Endoxan durch Beeinflußung der Endoxan-Umwandlung in-vivo .

Für die embryotoxischen Wirkungen von Endoxan können unter Umständen jedoch ganz andere Faktoren verantwortlich sein. Für eine solche Vermutung könnten Befunde von teratologischen Untersuchungen sprechen, die an Mäusen von BECKER und Mitarbeitern (28-30) erhoben wurden. In der vorliegenden Arbeit wird untersucht, ob Aktivatoren der mikrosomalen Endoxan-Metabolisierung in der Leber wie Phenobarbital und α-Hexachlorcyclohexan (α-HCH) und Inhibitoren wie SKF 525 A (β-Diäthylaminoäthylester d. Diphenylpropylessigsäure) und CFT 1201 (β-Diäthylaminoäthylester d. Phenyl-diallylessigsäure) die Wirkung von Endoxan auf Rattenembryonen beeinflußen können. Unter der Voraussetzung, daß die Alkylierung einer Zellkomponente der entscheidende biochemische Vorgang ist, sollte man er-

		metabolisiertes "aktiviertes" und gebundenes wasserlösliches Endoxan in	
		mütterlichem Serum	Fruchtwasser
		10^4 x dpm/ml	
Kontrolle	24 h	132 ± 15	141 ± 12
	48 h	130 ± 12	133 ± 14
+ CFT 1201	24 h	117 ± 15	105 ± 8
	48 h	94 ± 13	98 ± 10
+ α-HCH	24 h	188 ± 24	165 ± 10
	48 h	195 ± 20	199 ± 18
+ Phenobarbital	24 h	173 ± 12	160 ± 17
	48 h	123 ± 10	128 ± 15

Tabelle 17: Verteilung von metabolisiertem, wasserlöslichem Endoxan in mütterlichem Serum und Fruchtwasser. Dosierungen: 5 mg/kg Endoxan = 2 mCi/kg i.p. an Tag 12 der Schwangerschaft. Aufarbeitung 24 und 48 h später.

CFT 1201: 1 h vor Endoxangabe 75 mg/kg; 2,5 und 8 h nach Endoxangabe 50 mg/kg in H_2O gelöst oral.

α-HCH: 24 h von Endoxangabe 200 mg/kg in Rapsöl oral.

Phenobarbital: 72, 48 und 24 h_R vor Endoxangabe 100 mg/kg als Na-Salz (Luminal^R) in H_2O gelöst oral.

Serum und Fruchtwasser wurden mit CH_2CL_2 ausgeschüttelt zur Entfernung von unverändertem Endoxan; dann wurde ein Aliquot im Szintillationszähler gezählt.

warten, daß eine Stimulierung der Endoxan-Aktivierung zu einer höheren Mißbildungsrate führt und umgekehrt die Hemmung dieser Aktivierung die teratogene Wirkung von Endoxan einschränkt oder aufhebt. Überraschenderweise fand BECKER jedoch genau das Gegenteil: Nach Phenobarbital sank die Mißbildungsrate rapide und nach SKF 525 A stieg sie an (siehe Schema).

In Ergänzung der Befunde von BECKER, die sich im wesentlichen auf teratologische Versuche beschränkten, untersuchten wir mit biochemischen Mitteln die Verteilung der Alkylierung in verschiedenen Zellkomponenten sowie das Verhältnis von aktiviertem und nicht aktiviertem Endoxan in Serum und Fruchtwasser nach Vorbehandlung mit α-HCH, Phenobarbital und CFT 12o1. Im Unterschied zu BECKER führten wir jedoch unsere Untersuchungen an Ratten durch, da alle unsere Voruntersuchungen an dieser Spezies vorgenommen wurden. Die Injektion von ^{3}H-Endoxan erfolgte an Tag 12 der Schwangerschaft, und die Tiere wurden 24 beziehungsweise 48 h später untersucht.

Die Verteilung der Radioaktivität in der wasserlöslichen Phase von mütterlichem Serum und von Fruchtwasser ist so, wie man es nach der Art der Vorbehandlung erwarten sollte: Nach Stimulation der Endoxan-Aktivierung ist die Radioaktivität - besonders 24 h nach der Injektion - leicht erhöht, nach Hemmung durch CFT 12o1 erniedrigt. Beide Effekte sind nicht sehr ausgeprägt (Tabelle 17). Versucht man, die wasserlöslichen Anteile mit Hilfe einer kolorimetrischen Bestimmungsmethode zu differenzieren, bei der die "alkylierende" Eigenschaft getested wird (NBP-Methode), so zeigt sich, daß 24 h nach der Injektion praktisch kein freies, aktiviertes Endoxan nachgewiesen werden kann (Abbildung 23). Einschränkend muß allerdings gesagt werden, daß die kolotimetrische Methode sehr viel unempfindlicher ist als

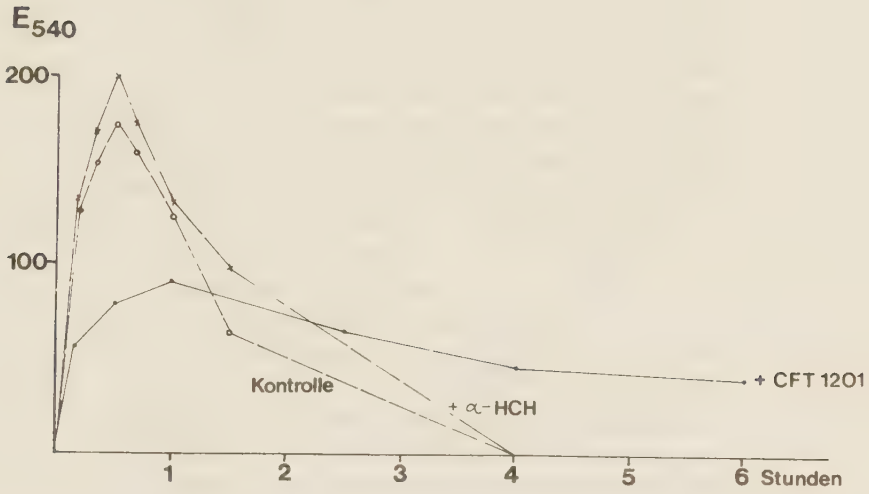
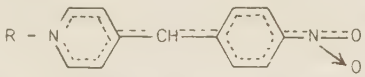


Abbildung 23 :

Zeitlicher Verlauf der Endoxan-Aktivierung.

Die Bestimmung der alkylierenden Form erfolgte kolorimetrisch im Serum mit dem NBP-Test von FRIEDMAN und BOGER (25). Die Struktur des gebildeten Farbstoffs wird von FRIEDMAN angegeben:



Endoxan-Dosierung: 100 mg/kg i.p. zur Zeit t = 0

αHCH: 200 mg/kg in Rapsöl oral 24 Stunden vor der Endoxangabe

CFT 1201: 75 mg/kg in H_2O oral 1 Stunde vor und 50 mg/kg 1,3 und 5 Stunden nach der Endoxangabe.

die radioaktive Messung. Immerhin läßt sich doch feststellen, daß der Anteil an freiem, aktiviertem Endoxan sicher kleiner als 3o % ist bezogen auf die Gesamtaktivität. Das bedeutet, daß der überwiegende Anteil an Radioaktivität an kleinmolekulare, d.h. wasserlösliche, Bestandteile gebunden sein muß. Man kann sich vorstellen, daß es sich dabei um Aminosäuren, Nucleotide u.ä. handelt. Ob diese alkylierten Moleküle noch in Makromoleküle eingebaut werden können, ist noch nicht geklärt. Um einen Eindruck von der nach Vorbehandlung veränderten Aktivierung von Endoxan zu bekommen, haben wir Kurzzeituntersuchungen über die "alkylierende" Aktivität mit der NBP-Methode im Serum nach Gabe von CFT 12o1 und α-HCH mit der hohen Dosis von 1oo mg/kg Endoxan durchgeführt (Abb. 23). Es zeigt sich, daß α-HCH nur eine geringfügig verstärkte Aktivierung ohne zeitliche Verschiebung bewirkt (Maximum der Aktivierung nach 3o Minuten). Nach CFT 12o1 ist das Maximum dagegen erst nach etwa 6o Minuten erreicht, und die Aktivität ist nach 6 Stunden erst auf etwas weniger als die Hälfte abgesunken, während nach α-HCH-Vorbehandlung und in der Kontrollserie nach 4 Stunden keine alkylierende Aktivität mehr gemessen werden kann. Dem entsprechen auch die Befunde bei der Bestimmung des nicht-aktivierten Endoxans in Serum und Fruchtwasser.

Nicht-aktiviertes Endoxan ist im Unterschied zu den aktivierten Vorstufen außer in Wasser auch in Methylenchlorid löslich. Vergleicht man diese methylenchlorid-löslichen Anteile, so findet man nach Gabe von Substanzen, die den Arzneistoffwechsel in der Leber aktivieren, wiederum das erwartete Ergebnis: Nach α-HCH oder nach Vorbehandlung mit Phenobarbital ist 24 h oder später weder im Fruchtwasser noch im mütterlichen Serum unverändertes Endoxan nachweisbar. Ein unerwaret ausgeprägter Effekt zeigt sich jedoch nach Vorbehandlung mit dem Hemmstoff mikro-

		Freies, nicht-aktiviertes in CH_2CL_2 lösliches ^3H-Endoxan in	
		Serum	Fruchtwasser
		10^4 dpm/ml	
Kontrolle	24 h	< 0,5	0,5
	48 h	< 0,5	< 0,5
+ CFT 1201	24 h	7,7	14,7
	48 h	1,2	1,6
+ α-HCH	24 h	< 0,5	0,5
	48 h	< 0,5	< 0,5
+ Phenobarbital	24 h	< 0,5	1,4
	48 h	< 0,5	< 0,5

Tabelle 18: Verteilung von freiem, nicht-aktiviertem Endoxan in Serum und Fruchtwasser.
Dosierungen: siehe Tabelle 17

		KONTROLLE		CFT 1201		α-HCH		Phenobarbital	
		24 h	48 h	24 h	48 h	24 h	48 h	24 h	48 h
säurelösl.	dpm/µg DNA	331 ± 18	260 ± 40	265 ± 25	185 ± 22	452 ± 12	442 ± 32	415 ± 14	328 ± 17
	%	100	158	80	112	136	266	125	198
Lipide	dpm/µg DNA	2,9 ± 0,3	3,6 ± 0,5	2,0 ± 0,3	2,4 ± 0,9	3,5 ± 0,4	5,0 ± 0,5	3,7 ± 0,3	4,4 ± 0,2
	%	100	248	69	166	121	344	128	304
RNA	dpm/µg DNA	0,9 ± 0,2	0,7 ± 0,1	0,8 ± 0,2	0,4 ± 0,1	1,1 ± 0,1	0,7 ± 0,1	0,9 ± 0,1	0,5 ± 0,03
	%	100	126	89	89	122	162	100	112
Glycosaminoglycane	dpm/µg DNA	2,9 ± 0,6	1,3 ± 0,4	1,8 ± 0,3	1,0 ± 0,2	2,8 ± 0,4	1,5 ± 0,1	2,7 ± 0,4	1,6 ± 0,1
	%	100	90	62	68	96	104	93	110
DNA	dpm/µg DNA	0,2 ±0,03	0,2 ±0,05	0,1 ±0,01	0,1 ±0,01	0,3 ±0,04	0,3 ±0,07	0,3 ±0,04	0,3 ±0,01
	%	100	200	50	100	150	300	150	300
Protein	dpm/µg DNA	3,9 ± 0,3	2,6 ± 0,3	2,5 ± 0,1	2,5 ± 0,6	4,6 ± 0,5	3,9 ± 0,2	5,5 ± 0,8	3,4 ± 0,3
	%	100	134	64	128	118	200	141	174

Tabelle 19: Einfluß von Substanzen, die die mikrosomalen Pharmakon-abbauenden Leberenzyme stimulieren bzw. inhibieren, auf die Alkylierung verschiedener Zellkomponenten durch ^{3}H-Endoxan nach 24 und 48 h in embryonalem Gewebe an Tag 13 und 14 der Schwangerschaft. Die 13 Tage Werte (= 24 h-Werte) werden dabei gleich 100% gesetzt. Das Wachstum der Embryonen von Tag 13 zu Tag 14 wird bei der prozentualen Berechnung mit dem Faktor 2 berücksichtigt.

Vorbehandlung: CFT 1201: 1 h vor Endoxangabe 75 mg/ kg in H_2O p.o. 2,5 und 8 h nach Endoxangabe 50 mg/kg p.o.
α-HCH: 24 h vor Endoxangabe 200 mg/kg in Rapsöl p.o.
Phenobarbital: 72, 48 und 24 h vor Endoxangabe 100 mg/kg in H_2O p.o.
An Tag 12 der Schwangerschaft 10^{00} Uhr eine einmalige Injektion i.p. von 5 mg/kg ^{3}H-Endoxan = 2 mCi/kg. 24 bzw. 48 h später werden die Embryonen präpariert und homogenisiert, und die Homogenate werden einer modifizierten OGUR-ROSEN Fraktionierung (s. "Methodik") unterworfen. Eine Ausnahme bilden lediglich die DNA-Werte. Hier handelt es sich ausschließlich um Bestimmungen isolierter und hochgereinigter DNA, da beim Kontrollorgan Leber die DNA-Werte nach OGUR-ROSEN stark verunreinigt wären.

	KONTROLLE		CFT 1201		α-HCH		PHENOBARBITAL	
	24 h	48 h	24 h	48 h	24 h	48 h	24 h	48 h
säurelösl. dpm/µg DNA	993 ± 15	664 ± 39	1120 ± 120	422 ± 75	1540 ± 204	902 ± 44	1296 ± 140	648 ± 123
%	100	66	111	43	155	91	131	69
Lipide dpm/µg DNA	55 ± 6,2	45 ± 5,2	60 ± 5,4	40 ± 4,2	71 ± 8,3	56 ± 6,5	74 ± 5,4	62 ± 4,8
%	100	82	109	73	129	102	134	113
RNA dpm/µg DNA	13 ± 2,3	15 ± 1,8	17 ± 1,7	16 ± 1,2	16 ± 2,1	13 ± 2,0	14 ± 1,2	13 ± 1,1
%	100	115	131	113	123	100	108	100
Glycosamino-dpm/µg DNA	143 ± 12	134 ± 17	314 ± 28	289 ± 34	156 ± 21	143 ± 16	140 ± 16	142 ± 10
glycane %	100	94	220	202	109	100	98	99
DNA dpm/µg DNA	0,2 ±0,02	0,3 ±0,05	0,3 ±0,01	0,3 ±0,02	0,4 ±0,02	0,5 ±0,06	0,4 ±0,06	0,4 ±0,04
%	100	80	60	60	80	100	80	80
Protein dpm/µg DNA	52 ± 5,4	54 ± 8,3	53 ± 7,1	49 ± 7,4	61 ± 8,3	61 ± 4,8	79 ±9,1	70 ± 6,6
%	100	104	102	96	117	117	152	134

Tabelle 20 : Einfluß von Substanzen, die die mikrosomalen Pharmakon-abbauenden Enzyme stimulieren bzw. inhibieren, auf die Alkylierung verschiedener Zellkomponenten durch ^{3}H-Endoxan in Lebergewebe. (nach 24 und 48 Stunden)

Die Kontrollwerte nach 24 Stunden wurden dabei gleich 100% gesetzt
Vorbehandlung und Versuchsanordnung sind identisch mit denen von Tabelle 19 .

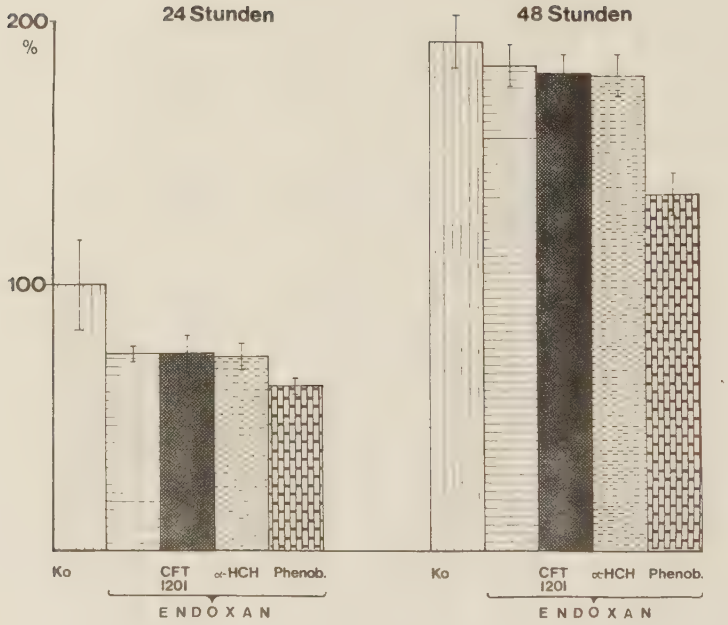


Abbildung 24:

Wachstum der Embryonen zwischen Tag 13 und 14 der Schwangerschaft bei unbehandelten Tieren (43), nach Endoxan und nach Vorbehandlung der Endoxan-Tiere mit CFT 1201, α-HCH und Phenobarbital.
Die Dosierungen entsprechen denen von Tabelle 19 . Bestimmt wurde das Feuchtgewicht der Embryonen; das Gewicht der Kontrolltiere an Tag 13 der Schwangerschaft (37 mg Feuchtgewicht) wurde gleich 100% gesetzt.

somaler Oxidasen in der Leber - dem CFT 12o1: 24 h nach Gabe von ^{3}H-Endoxan ist die Radioaktivität des Methylenchlorid-löslichen Anteils im mütterlichen Serum und vor allem auch im Fruchtwasser noch außerordentlich hoch ! Dies entspricht vollkommen den in Tab. 18 gezeigten Kurzzeitversuchen mit hohen Endoxan-Dosen. Eine signifikante Erhöhung dieses unveränderten Endoxans ist sogar noch 48 h nach der Injektion in Serum und Fruchtwasser zu beobachten (Tab. 18). Dies ist der auffallendste Befund, der nach einer CFT-12o1-Vorbehandlung beobachtet werden kann, und es liegt nahe, ihn mit der verstärkten embryotoxischen Wirkung in Zusammenhang zu bringen.

Mit einem modifizierten OGUR-ROSEN-Verfahren wurde in weiteren Versuchsserien der Alkylierungsgrad von Lipiden, RNA, DNA, Glycosaminoglycanen und Proteinen nach verschiedener Vorbehandlung bestimmt. Als Maß dient auch hier die Radioaktivität in den Zellfraktionen 24 und 48 h nach der Injektion von ^{3}H-Endoxan. Zum Vergleich werden die entsprechenden Werte aus den Lebern der Muttertiere angegeben; alle Werte sind Mittelwerte aus 7 - 8 Tieren. Da nur die Zu- oder Abnahme der Alkylierung von Interesse ist, wurden wegen der besseren Übersichtlichkeit jeweils die 24-h-Werte gleich 1oo % gesetzt und die anderen Werte darauf bezogen. Bei den Embryonen mußte weiterhin das Wachstum in 24 h berücksichtigt werden, das aus der Zunahme des DNA-Gehalts/Embryo berechnet wurde (Tab. 19).

Nach CFT 12o1 ist die Alkylierung in RNA und in Glycosaminoglycanen erhöht; nach α-HCH und Phenobarbital in den Lipiden und den Proteinen. Insgesamt entsprechen alle Verschiebungen in den Alkylierungsraten weitgehend denen, die man nach der jeweiligen Art der Vorbehandlung erwarten müßte, aber keine ist so ausgeprägt, daß man in ihr

		EMBRYO				LEBER			
		Kontrolle		+ Cystein		Kontrolle		+ Cystein	
		12 h	36 h	12 h	36 h	12 h	36 h	12 h	36 h
säurelösl.	dpm/µg DNA	190 ± 24	92 ± 12	224 ± 28	126 ± 16	322 ± 34	204 ± 26	340 ± 18	296 ± 38
	%	100	96	118	132	100	63	106	92
Lipide	dpm/µg DNA	0,8 ± 0,1	0,9 ± 0,1	0,8 ± 0,1	1,2 ± 0,1	16,3 ± 2,1	30,4 ± 3,8	13,9 ± 1,4	35,1 ± 4,1
	%	100	224	100	300	100	187	85	215
RNA	dpm/µg DNA	0,5 ±0,04	0,2 ±0,01	0,8 ±0,06	0,4 ±0,02	5,1 ± 0,8	4,2 ± 0,7	4,2 ± 0,4	5,5 ± 0,8
	%	100	80	160	160	100	82	82	107
Glycosamino-glycane	dpm/µg DNA	1,1 ± 0,2	0,4 ±0,06	1,3 ± 0,2	0,4 ±0,08	44,0 ± 6,2	22,8 ± 2,8	36,8 ± 7,2	25,5 ± 4,8
	%	100	72	118	72	100	52	84	58
Kohlehydrate	dpm/µg DNA	0,4 ±0,02	0,2 ±0,01	0,5 ±0,08	0,2 ±0,06	2,0 ± 0,5	1,6 ± 0,3	1,6 ± 0,2	1,8 ± 0,3
	%	100	100	125	100	100	80	80	90
DNA	dpm/µg DNA	0,2 ±0,03	0,2 ±0,05	0,3 ±0,08	0,2 ±0,02	0,1	0,1	0,1	0,1
	%	100	200	150	200	100	100	100	100
Protein	dpm/µg DNA	4,9 ± 0,6	3,2 ± 0,3	3,9 ± 0,5	2,6 ± 0,2	28,9 ± 3,5	25,3 ± 2,8	21,8 ± 1,8	18,5 ± 2,0
	%	100	130	80	106	100	88	75	64

Tabelle 20: Einfluß der Vorbehandlung mit L-Cystein auf die Alkylierung verschiedener Zellkomponenten durch ^{3}H-Endoxan in embryonalem Gewebe an Tag 13 und 14 der Schwangerschaft
Vorbehandlung: 20 Min. vor Endoxangabe 1000 mg/kg L-Cystein in H_2O p.o.. An Tag 12 der Schwangerschaft + 12 Stunden (22^{00} Uhr) eine einmalige Injektion von 10 mg/kg ^{3}H-Endoxan ≙ 1 mCi/kg. Aufarbeitung 12 und 36 Stunden später.
Die weitere Versuchsanordnung und -auswertung entspricht der von Tabelle 19.

eine Erklärung für die Veränderung der embryotoxischen Wirkung von Endoxan nach CFT 12o1 einerseits und nach α-HCH und Phenobarbital andererseits finden könnte. Wir haben gleichzeitig die Wachstumsgeschwindigkeit der Embryonen nach den verschiedenen Behandlungsarten durch Messung des DNA-Gehaltes bestimmt. Eine Retardierung des Wachstums ergab sich nur nach Phenobarbital-Behandlung. Ob diese Retardierung an der Verminderung des teratogenen Effektes beteiligt sein kann, ist zur Zeit schwer zu beurteilen.

Der einzige auffällige Befund dieser Versuchsserie bleibt damit die starke Anreicherung von nicht-aktiviertem Endoxan in Serum und Fruchtwasser nach CFT 12o1, so daß sich auch vom biochemischen Standpunkt ein Anhalt dafür ergibt, daß die Hypothese von BECKER, daß unverändertes Endoxan für die embryotoxische Wirkung verantwortlich ist, berechtigt sein könnte. Weitere Untersuchungen sind unbedingt erforderlich, um diese Frage zu klären und entsprechende Experimente - z.B. über die mögliche Bedeutung einer Acrolein-Bildung - sind in unserer Arbeitsgruppe in Vorbereitung.

In einer weiteren Versuchsserie wurde getestet, ob L-Cystein, das die Endoxan-Wirkung einschränken sollte durch Bindung der "aktivierten" Form im Serum, ebenfalls die Alkylierungsrate der einzelnen Fraktionen beeinflußen kann. Aber die Verwendung selbst hoher Dosen von Cystein erweist sich als ungeeignet zur Klräung dieser Frage. Einschränkend muß jedoch zu allen diesen Befunden gesagt werden, daß es im Augenblick mit den verwandten Methoden noch nicht möglich ist, einzelne definierte Verbindungen aus so heterogen zusammengesetzten Gruppen wie Proteine, Lipide oder RNA gezielt zu analysieren. Der biologische Wirkungsmechanismus alkylierender Substanzen gibt damit immernoch eine große Zahl von Rätseln auf.(13, 18)

D. Zusammenfassung und Schlußfolgerungen

1. Partiell gereinigte DNA-Polymerase aus Lebergeweben verschiedener Spezies (Ratte, Maus, Meerschweinchen, Kaninchen, Fisch) wurde auf ihre Fähigkeit untersucht, verschiedene DNA-Arten (Zellkerne und Mitochondrien) verschiedener Spezies (siehe oben) und verschiedener Konfigurationen (nativ, denaturiert) als "primer" oder "template" zu benutzen. Es konnte gezeigt werden, daß mitochondriale DNA-Polymerase - entgegen den Befunden anderer Autoren - nicht in der Lage ist, zwischen Zellkern- und Mitochondrien-DNA als Matrize zu unterscheiden, wenn die Einbaurate von TTP als Kriterium benutzt wird. Hingegen können erhebliche Unterschiede in der TTP-Einbaurate beobachtet werden, wenn verschiedene spezieseigene und speziesfremde Matrizen in den Polymerase-Test eingesetzt werden. Diese Fähigkeit zur Speziesunterscheidung wurde aber nur bei der Polymerase von Maus und Meerschweinchen gefunden, nicht aber bei der in pharmakologischen Versuchen am häufigsten benutzten Spezies Ratte. Außerdem bevorzugten die Polymerasen von Maus und Meerschweinchen native DNA als Matrize - wiederum im Unterschied zur Ratten-Mitochondrien-Polymerase.

   Wir schlossen aus diesen Ergebnissen, daß DNA-Polymerase in-vivo offenbar im Verein mit anderen Komponenten und Enzymen als Multienzym-Komplex funktioniert und daß diese Komplexe bei den einzelnen Spezies während der Aufarbeitung und gegebenenfalls auch Anreicherung des Enzyms in unterschiedlichem Maße zur Dissoziation neigen.

   Bei der Bevorzugung der mitochondrialen Polymerase für Mitochondrien-DNA, die andere Arbeitsgruppen gefunden

haben, handelt es sich nach unserer Ansicht wahrscheinlich um ein "Artefact", das heißt um das Ergebnis einer Reaktion der DNA mit DNase, das bei dem angewandten Verfahren des Mitochondrien-Aufbrechens durch "freezing-thawing" aufgetreten sein könnte. Zu dieser Annahme kamen wir durch den Befund, daß nach Behandlung von Zellkern- und Mitochondrien-DNA mit Spuren von DNase deren Matrizenaktivität um das etwa 8-fache anstieg. Angaben über die eingesetzte Mitochondrien-DNA (Reinheit, Sedimentationskoeffizient, Anteil von "open-ring-form" und partiell degradierter DNA) wurden von anderen Untersuchern nicht gemacht.

Auch der Anstieg der terminalen Nucleotidyltransferase-Aktivität, der bei diesen Autoren bei intensiver Reinigung der Polymerase auftrat, mag durch das Vorhandensein von DNA-Bruchstücken in der benutzten Matrizen-Präparation erklärt werden. Auch in unseren Untersuchungen stieg der Anteil der "unspezifischen" Einbaureaktion an, wenn partiell degradierte mitochondriale DNA (nach DNase-Behandlung) in das System eingesetzt wurde.

Weitergehende Untersuchungen der Dissoziation des hypothetischen Polymerase-Komplexes und der Reaktion mit der mitochondrialen DNA-Matrize sind allerdings mit den uns bisher zur Verfügung stehenden Mitteln kaum noch möglich. Eventuell ließen sich jedoch weitere Informationen durch die Anwendung aufwendiger Mikrotechniken wie analytische Ultrazentrifugation erzielen. Derartige Untersuchungen werden zur Zeit in unserer Arbeitsgruppe vorbereitet.

2. Neben diesen Untersuchungen der direkten Wechselwirkung zwischen DNA-Matrize und der Polymerase inter-

essierte uns ganz besonders die Beeinflußung dieser Reaktion durch alkylierende Substanzen, d.h. vor allem durch Endoxan, dessen Besonderheit darin besteht, daß es erst im mikrosomalen Enzymsystem der Leber in die aktiv alkylierende Verbindung umgewandelt werden muß. Außer dem allgemeinen theoretischen besaß diese für uns ein besonderes Interesse, da sie eine starke embryotoxische Wirkung besitzt, die nach den Beobachtungen anderer Autoren nicht unbedingt mit dem Alkylierungsgrad korreliert ist.

Durch Anwendung von Tritium-markiertem Endoxan konnten wir zeigen, daß die alkylierten Anteile der DNA nicht durch einen "repair"-Mechanismus aus dem schnell wachsenden embryonalen Gewebe entfernt wird, wobei offen bleibt, wie sich der Organismus trotz hoher Alkylierung auch bei subtoxischen Dosen normal weiter entwickeln kann. Es wäre denkbar, daß stark geschädigte Zellen bei der intensiven Proliferation ausgeschlossen werden und zugrunde gehen. Auch bei Strahlenschädigungen ist bekannt, daß z.B. das Ausmaß von Chromosomenschäden nach einiger Zeit deutlich vermindert wird. Etwas ähnliches könnte sich auch nach der Einwirkung von Alkylantien abspielen.

Mit ^{3}H-Endoxan konnten wir ferner nachweisen, daß mitochondriale DNA wesentlich stärker markiert wird als Zellkern-DNA. Diesem unterschiedlichen Verhalten kann unter Umständen eine Bedeutung bei der Erklärung der Wirkungsweise von Endoxan zukommen.

Durch Verwendung von radioaktiv markierten Aminosäuren in-vivo bei gleichzeitiger Endoxan-Behandlung konnten wir - zumindest für mitochondriale DNA - ausschliessen, daß ein "cross-linking" von DNA und Proteinanteilen in nennenswertem Umfang auftritt. Obgleich bei der Zell-

kern-DNA eine solche Vernetzung von DNA mit Proteinen durch unsere experimentellen Daten wahrscheinlich gemacht wurde, ist die Bedeutung dieses Phänomens bei der Erklärung der embryotoxischen oder cytostatischen Wirkungsweise unklar.

Ein unterschiedliches Verhalten der DNA-Synthese in Mitochondrien und in Zellkernen konnte auch in-vivo nach Endoxan-Vorbehandlung festgestellt werden: Während der Zellkern-DNA-Stoffwechsel - gemessen am ^{3}H-Thymidin-Einbau - kaum beeinflußt wird, zeigte die mitochondriale DNA-Synthese eine verhältnismäßig starke Stimulierung.

Eine Untersuchung der Polymerasereaktionen in-vitro nach einer Vorbehandlung mit Endoxan in-vivo führt zu ähnlichen Ergebnissen, wobei es praktisch gleichgültig ist, ob die DNA oder das Enzym mit Endoxan vorbehandelt ist. Die mitochondriale DNA-Synthese ist auch in diesem System stimulierbar. Mögliche Wirkungsmechanismen werden diskutiert.

Vorbehandlung der Versuchstiere vor Endoxan-Gabe mit Substanzen, die die Endoxan-Aktivierung in den Lebermikrosomen entweder hemmen oder stimulieren müßte entsprechend zu einer schwächeren beziehungsweise zu einer stärkeren embryotoxischen Wirkung führen. Entsprechende Versuche von BECKER et al. zeigten jedoch genau das Gegenteil.

Unsere Untersuchungen des Alkylierungsgrades der einzelnen Zellkomponenten ergaben jedoch vor allem bei der DNA keine gravierenden Veränderungen in der zu erwartenden Richtung bei den verschiedenen Vorbehandlungen. Insbesondere war der Alkylierungsgrad nach Vorbehandlung mit CFT 1201 - einem Hemmstoff der mikrosomalen "mixed-function"-oxydases, die oxydative Umwandlungen an vielen körperfremden Stoffen durchführen - nicht erhöht, wie man bei verstärktem

embryotoxischem Effekt hätte erwarten können.

Große Differenzen traten nur beim nicht-aktivierten, Methylenchlorid-löslichen Endoxan auf. Erwartungsgemäß war nach Vorbehandlung mit dem die Aktivierung hemmenden CFT 1201 dieser nicht-aktivierte Anteil besonders hoch. Da aber Endoxan nach Vorbehandlung mit CFT 1201 in besonderem Maße embryotoxisch wirkt, können unsere Ergebnisse die Hypothese von BECKER et al. nicht widerlegen, die besagt, daß für die embryotoxische Wirkung von Endoxan vor allem die nicht-aktivierte Form und damit auch nicht die Alkylierung verantwortlich sei. Andere Möglichkeiten, wie Endoxan seine embryotoxische Wirkung entfalten könnte, werden diskutiert.

E. LITERATURVERZEICHNIS

1. AAIJ, C., SACCONE, C. BORST, P., GADALETA, M.N.:
Hybridization Studies with RNA-Synthesized by Isolated Rat-Liver Mitochondria
in: BBA 199, 373 (1970)

2. ALARCON, R.A., MEIENHOFER, J. : Formation of the Cytotoxic Aldehyde Acrolein during in-vitro Degradation of Cyclophosphamide
in: Nature New Biology 233, 250 (1970)

3. ALEXANDER, P., LETT, J.T. : The Biological Significance of the Changes Produced in the Deoxyribonucleic Acid of Cells Treated with the Radiomimetic Alkylating Agents
in: Biochem. Pharmacol. 4, 34 (1960)

4. BASS, R.: Dissertation 1967, Freie Universität Berlin

5. BASS, R. NEUBERT, D. und MORRIS, H.P. : Thymidin-Einbau in die Mitochondrien DNS von Rattenleber und hepatocellulären Tumoren
in: Naunyn-Schmiedebergs Arch. 255, 2 (1966)

6. BESSMAN, M.J., LEHMANN, J.R., SIMMS, E.S., KORNBERG, A. :
Enzymatic Synthesis of Deoxyribonucleic Acid
II. General Properties of the Reaction
in: JBC 233, 171 (1962)

7. BOLLUM, F.J. : Calf Thymus Polymerase
in: JBC 235, 2399 (1964)

8. BORST, P., RUTTENBERG, G.J.C.M., KROON, A.M. : Mitochondrial DNA: I Preparation and Properties of Mitochondrial DNA from Chick Liver
in: BBA 149, 140 (1967)

9. BORST, P., KROON, A.M. : Mitochondrial DNA: Physicochemical Properties, Replication, and Genetic Function
in: Cytology 26, 107 (1969)

10. BORST, P., AAIJ, C. : Identification of the Heavy Strand of Rat-Liver Mitochondrial DNA as the Messenger Strand
in: BBRC 34, 358 (1969)

11. BRAKKE, M.K. : Density Gradient Centrifugation. A New Separation Technique
J. Amer. Chem. Soc. 73, 1847 (1951)

12. BRAKKE, M.K. : Zonal Separation by Density Gradient Zentrifugation
in: Arch. Biochem. Biophys. 45, 275 (1953)

13. BRINCKER, H. : Protection of C3H-Mice against Toxic Effects of Endoxan by Means of Cysteine Hydrochloride
in: Acta path. et microbiol. scandinav.
61, 321 (1964)

14. BROCK, N., HOHORST, H.-J. : Metabolism of Cyclophosphamide
in: Cancer 20, 900, (1967)

15. BROOKES, P., LAWLEY, P.D. : Alkylating Agents
in: Brit. med. Bull. 20, 91 (1964)

16. BURTON, K. : A Study of the Conditions and Mechanism of the Diphenylamine Reaction for the Colorimetric Estimation of Deoxyribonucleic Acid
in: Biochem. J. 62, 315 (1956)

17. CLAYTON, D.A., VINOGRAD, J. : Circular Dimer and Catenate Form of Mitochondrial DNA in Human Leucocytes
in: Nature 216, 652 (1967)

18. CONNORS, T.A. : Protection Against the Toxicity of Alkylating Agents by Thiols: The Mechanism of Protection and its Relevance to Cancer Chemotherapy
in: Europ. J. Cancer 2, 293 (1966)

19. DAWID, J.B., : Deoxyribonucleic Acid in Amphibian Eggs
in: J. Mol. Biol. 12, 581 (1965)

20. DAWID, J.B.: Evidence for the Mitochondrial Origin of Frog Egg Cytoplasmic DNA
in: PNAS 56, 269 (1966)

21. DAWID, J.B., WOLSTENHOLME, D.R. : Ultracentrifuge and Electron Microscope Studies on the Structure of Mitochondrial DNA
in: J. Mol. Biol. 28, 233 (1967)

22. DeLUCIA, P., Cairns, J. : Isolation of an E. coli Strain with a Mutation Affecting DNA Polymerase
in: Nature 224, 1164 (1969)

23. DOTY, P., MARMUR, J., EIGNER, J., SCHILDKRAUT, C.: Strand Separation and Specific Recombination in Deoxyribonucleic Acids: Physical Chemical Studies
in: PNAS, 46, 461 (1960)

24. ENGELS, K., KROWKE, R., NEUBERT, D.: Vergleichende Untersuchungen über die Alkylierung von embryonalem und mütterlichem Gewebe durch Cyclophosphamid
in: Naunyn-Schmiedebergs Arch. 260, 110 (1968)

25. FRIEDMAN, O.M., BOGER, B.A. : Colorimetric Estimation of Nitrogen Mustards in Aqueous Media: Hydrolytic Behavior of Bis (beta-chloroethyl)-amine, nor-HN_2
in: Anal. Chem. 33, 906 (1961)

26. FRIEDMAN, O.M. : Recent Biologic and Chemical Studies of Cyclophosphamide
in: Cancer Chemotherapy Reports 51, 327 (1967)

27. GEIDUSCHEK, E.P. : "Reversible" DNA
in: PNAS 47, 950 (1961)

28. GIBSON, J.E., BECKER, B.A. : The Teratogenity of Cyclophosphamide in Mice
in: Cancer Research 28, 475 (1968)

29. GIBSON, J.E., BECKER, B.A. : Effect of Phenobarbital and SKF 525 A on the Teratogenity of Cyclophosphamide in Mice
in: Teratology 1, 393 (1969)

30. GIBSON, J.E., BECKER, B.A. : Teratogenity of Structural Truncates of Cyclophosphamide in Mice
in: Teratology 4, 141 (1969)

31. GOLDACRE, R.J., LOVELESS, A., ROSS, W.C.J. : Mode of Production of Chromosome Abnormalities by the Nitrogen Mustards
in: Nature 163, 667 (1949)

32. GRAUL, E.H., SCHAUMLÖFFEL, E., HUNDSHAGEN, H., WILMANNS, H. SIMON, G.: Metabolism of Radioactive Cyclophosphamide
in: Cancer 20, 896 (1967)

33. HELGE, H. NEUBERT, D., BASS, R., BROCK, N. : Einfluß von Cyclophosphamid auf die RNS-Synthese in Zellkernen und Mitochondrien.
in: Naunyn-Schmiedebers Arch. 253, 44 (1966)

34. HELGE, H. : HABILITATIONSSCHRIFT, Freie Universität Berlin (1968)

35. HELGE, H., OBERDISSE, E., ENGELS, K. : Hemmbarkeit der DNA-Polymerase in Zellkernen und Mitochondrien von Leber- und Tumorgewebe durch Cyclophosphamid
in: Naunyn-Schmiedebergs Arch. 260, 139 (1968)

36. HILL, D.L., KIRK, M.C., STRUCK, F.R. : Isolation and identification of 4-Ketocyclophosphamide, a Possible Active Form of the Antitumor Agent Cyclophosphamide.
in: J. Amer. Chem. Soc. 92, 3207 (1970)

37. HUDSON, B., VINOGRAD, J. : Catenated Circular DNA Molecules in HeLa Cell Mitochondria
in: Nature 216, 647 (1967)

38. KALF, G.F.: Deoxyribonucleic Acid in Mitochondria and its Role in Protein Synthesis
in: Biochemistry 3, 1702 (1964)

39. KALF, G.F., CH'IH, J. : Purification and Properties of Deoxyribonucleic Acid Polymerase from Rat Liver Mitochondria
in: JBC 243, 4904 (1968)

40. KAY, E.R.M., SIMMONS, N.S., DOUNCE, A.L. : An Improved Preparation of Sodium Deoxyribonucleate
in: J. Amer. Chem. Soc. 74, 1724 (1952)

41. KEIR, H.M. : DNA Polymerases from Mammalian Cells
in: Progress in Nucleic Acid Research 4, 81 (1965)

42. KIRBY, K.S., COOK, E.A. : Isolation of Deoxyribonucleic Acid from Mammalian Tissues
in: Biochem. J. 104, 254 (1967)

43. KÖHLER, E. : Habilitationsschrift, Freie Universität Berlin (1969)

44. KOHN, W.K., SPEARD, C.L., DOTY, P. : Inter-Strand Crosslinking of DNA by Nitrogen Mustard
in: J. Mol. Biol. 19, 266 (1966)

45. KOHN, W.K., GREEN, D.M. : Transforming Activity of Nitrogen Mustard-crosslinked DNA
in: J. Mol. Biol. 19, 289 (1966)

46. KORNBERG, A. : "Enzymatic Synthesis of DNA",
erschienen bei: Wiley; London, New York (1961)

47. KORNBERG, A.: Regulation of Nucleic Acid and Protein Synthesis
erschienen bei: Elsevier; Amsterdam (1967)

48. KROWKE, R., PIELSTICKER, K., SIEBERT, G. : A Simple Fractionation Procedure for Studying Incorporation of Radioactivity Labelled Precursors into Mammalian Main Cell Components
in: Naunyn-Schmiedebergs Arch. 271, 121 (1971)

49. KROWKE, R., SIEBERT, G., NEUBERT, D. : Biochemical Screening Test with ^{14}C-Glucose and ^{32}P-Phosphate for the Evaluation of Embryotoxic Effects in-vivo
in: Naunyn-Schmiedebergs Arch. 271, 274 (1971)

50. LAWLEY, P.D. : Effects of some Chemical Mutagen and Carcinogen on Nucleic Acids
in: Progress in Nucleic Acids Research 5, 89 (1966)

51. LISS, E. : DNA-Synthese, Wachstum und Teilung von Ascites-Tumorzellen unter dem Einfluß alkylierender Substanzen
in: Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. 349, 1253 (1968)

52. LOVELESS, A. : Qualitative Aspects of the Chemistry and Biology of Radiomimetic (Mutagenic) Substances
in: Nature 167, 338 (1951)

53. LUCK, D.J.L., REICH, E. : DNA in Mitochondrial of Neurospora Crassa
in: PNAS 52, 931 (1964)

54. MARMUR, J., LANE, D. : Strand Separation and Specific Recombination in Deoxyribonucleic Acids: Biological Studies
in: PNAS 46, 453 (1960)

55. MARMUR, J.,: A Procedure for the Isolation of Deoxyribonucleic Acid from Microorganisms
in: J. Mol. Biol. 3, 208 (1961)

56. MESELSON, M., STAHL, F.W., VINOGRAD, J. : Equilibrium Sedimentation of Macromolecules in Density Gradients
in: PNAS 43, 581 (1957)

57. MESELSON, M., STAHL, F.W. : The Replication of DNA in E. coli
in: PNAS 44, 671 (1958)

58. MEYER, R.R., SIMPSON, M.V. : DNA Biosynthesis in Mitochondria: Partial Purification of a Distinct DNA-Polymerase from Isolated Rat Liver Mitochondria
in: PNAS 61, 130 (1968)

59. MUNRO, H.N., FLECK, A.: The Determination of Nucleic Acids
in: Methods of Biochemical Analysis 14, 113 (1966)

60. NASS, S., NASS, M.M.K., HENNIX, U.: Deoxyribonucleic Acid in Isolated Rat Liver Mitochondria
in: BBA 95, 426 (1965)

61. NASS, M.M.K. : Mitochondrial DNA: Advances, Problems, and Goals
in: Science 165, 25 (1969)

62. NEUBERT, D., HELGE, H. BASS, R. : Einbau von Thymidin in die Desoxyribonucleinsäure von Mitochondrien
in: Naunyn-Schmiedesbergs Arch. 252, 258 (1965)

63. NEUBERT, D.: Beeinflussung des Nucleinsäure- und Protein-Stoffwechsels durch Pharmaka
in: Der Internist 7, 436 (1966)

64. NEUBERT, D.: Vergleichende Untersuchungen über die Nucleinsäuresynthese in Zellkernen und Mitochondrien und ihre Beeinflußbarkeit durch Pharmaka
in: Naunyn-Schmiedebergs Arch. 253, 152 (1966)

65. NEUBERT, D., OBERDISSE, E., SCHMIEDER, M., REINSCH, I.: Solubilisation and some Properties of Vertebrate Mitochondrial DNA Polymerase
in: Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. 348, 1709 (1967)

66. NEUBERT, D., OBERDISSE, E., BASS, R. : Biosynthesis and Degradation of Mammalian Mitochondrial DNA
in: Biochemical Aspects of the Biogenesis of Mitochondria 103, Bari 1968

67. NEUBERT, D.: Zur Wirkungsweise von Cytostatika
in: Verhandlungsbericht der Deutschen Gesellschaft für Urologie, Berlin 1968

68. NEUBERT, D., TESKE, S., SCHMIEDER, M., KÖHLER, E., OBERDISSE,E.: Vergleichende Untersuchungen über die DNA-Polymeraseaktivität in isolierten Mitochondrien und Kernen von Wirbeltierzellen
in: Naunyn Schmiedebergs Arch. 262, 264 (1969)

69. NEUBERT, D., KÖHLER, E.: Comparative Studies on Nucleic Acid Metabolism During Mammalian Embryonic Development and During Proliferation of Other Tissues Induced by Hormons or Drugs
in: Proceedings of the Fourth International Congress on Pharmacology, Basel 1969

70. OKAZAKI, T., KORNBERG, A. : Enzymatic Synthesis of Deoxyribonucleic Acid XV. Purification and Properties of a Polymerase from Bacillus subtilis
in: JBC 239, 259 (1964)

71. OGUR, M., ROSEN, G. : The Nucleic Acids of Plant Tissue: I. The Extraction and Estimation of Deoxypentose Nucleic Acid and Pentose Nucleic Acid
in: Arch. Biochem. 25, 262 (1950)

72. PAETKAU, V., MORGAN, A.R.: Role of DNA-Polymerase
in: Nature New Biology 234, 36 (1971)

73. PARSONS, J.M. : Mitochondrial Incorporation of Tritiated Thymidine in Tetrahymena Pyriformis
in: J. Cell Biol. 25, 641 (1965)

74. PARSONS, P., SIMPSON, M.V.: Biosynthesis of DNA by Isolated Mitochondria: Incorporation of Thymidine-Triphosphate-2-^{14}C
in: Science 155, 91 (1967)

75. PARSONS, P., SIMPSON, M.V.: Biochemical Aspects of the Biogenesis of Mitochondria 171, Bari 1968

76. RABINOWITZ, M., SINCLAIR, J., DESALLE, L., HASELKORN, R., SWIFT, H.H. : Isolation of Deoxyribonucleic Acid from Mitochondria of Chick Embryo Heart and Liver
in: PNAS 53, 1126 (1965)

77. RABINOWITZ, M.: Extranuclear DNA
in: Bull. Soc. Chim. Biol. 50, 311 (1968)

78. RAUEN, H.M., NORPOTH, K. : Die biologische "Aktivierung von Endoxan
in: Naturwissenschaften 52. 477 (1965)

79. SCHATZ, G., HASLBRUNNER, E., TUPPY, H.: Deoxyribonucleic-Acid Associated with yeast Mitochondria
in: BBRC 15, 127 (1964)

80. SCHATZ, G., HASLBRUNNER, E., TUPPY, H. : Intramitochondriale Deoxyribonucleinsäure in Säugetierzellen
in: Monatshefte für Chemie 95. 1135 (1964)

81. SCHMIEDER, N., NEUBERT, D. : Nachweis einer DNs-Polymerase-Aktivität in den isolierten Mitochondrien von Warmblüterzellen
in: Naunyn-Schmiedebergs Arch. 255. 68 (1966)

82. SCHMIDT, G., TANNHAUSER, S.J. : A Method for the Determination of Deoxyribonucleic Acid, Ribonucleic Acid and Phosphorproteins in Animal Tissues
in JBC 161, 293 (1945)

83. SVEDBERG, T., PEDERSEN, K.O. : The Ultracentrifuge
erschienen bei: Clarendon Press (1940)

84. VINOGRAD, J., HEARST, J.E. : Equilibrium Sedimentation of Macromolecules and Viruses in a Density Gradient
in: XX. Fortschritte der Chemie organischer Naturstoffe 372, Wien 1962

85. VINOGRAD, J., LEBOWITZ, J., RADLOFF, R., WATSON, R., LAIPIS, P.: The twisted Circular Form of Polyoma Viral DNA
in: ONAS 53, 1104 (1965)

86. WARWICK, G.P. : The Mechanism of Action of Alkylating Agents
in: Cancer Research 23, 1315 (1963)

87. WATSON, J.D., CRICK, F.H.: Molecular Structure of Nucleic Acids: A Structure for Deoxyribonucleic Acid in: Nature 171, 737 (1953)

88. WATSON, J.D., CRICK, F.H.: Genetical Implications of the Structure of Deoxyribonucleic Acid in: Nature 171, 964 (1953)

89. WERNER, R.: Nature of DNA-Precursors in: Nature New Biology 233, 99 (1971)

90. WHEELER, G.P.: Some Biochemical Effects of Alkylating Agents in: Federation Proceedings 26, 885 (1967)

91. WIDNELL, C.C., TATA, J.R. : A Procedure for the Isolation of Enzymically Active Rat Liver Nuclei in: Biochem. J. 92, 313 (1964)

92. WINTERSBERGER, E.: Occurence of DNA-Polymerase in Isolated Yeast Mitochondria in: BBRC 25, 1 (1966)

93. WOLSTENHOLME, D.R., DAWID, J.R.: Circular Mitochondrial DNA from Xenopus Laevis and Rana Pipiens in: Chromosoma 20, 445 (1967).

94. GRUNICKE, H., LIERSCH, M., HOLZER, H. und ARNOLD, H.: Untersuchungen vom Wirkungsmechanismus von Endoxan in: Biochemical Pharmacology 14, 1485 (1965)

95. SCHNEIDER, W.C. und KUFF, E.L.: The Isolation and some Properties of Rat Liver Mitochondrial Deoxyribonucleic Acid in: PNAS 54, 165o (1965)

L I T E R A T U R aus Büchern

The Nucleic Acids Vol. 1-3; Academic Press, New York (1955)
CHARGAFF, E. und DAVIDSON, J.N.

The Biochemistry of the Nucleic Acids, Methuen, London (1969)
DAVIDSON, J.N.

Cold Spring Habor Symposium on Quantitative Biology:
"Synthesis and Structure of Macromolecules"Vol. 28 (1963)

Cold Spring Habor Symposium on Quantitative Biology:
"Replication of DNA in Micro-organisms" Vol. 34 (1968)

Progress in Nucleic Acid Research, Academic Press, New York
Vol. 1 - 9 (1963 - 69)

Methods in Enzymology XII. Nucleic Acids, Academic Press
New York und London (1967)

Abkürzungen der Zeitschriften

Acta Path. et Microbiol. Scandinav. =
Acta Pathologica et Microbiologica Scandinavica, Series A u.B

Anal. Chem. =
Analytical Chemistry

Arch. Biochem. Biophys. =
Archives of Biochemistry and Biophysics

BBA =
Biochimica et Biophysica Acta

BBRC =
Biochemical and Biophysical Research Communications

Biochem. J. =
Biochemical Journal

Biochem. Pharmacol.=
Biochemical Pharmacology

Brit. Med. Bull. =
British Medical Bulletin

Bull. Soc. Chim. Biol. =
Bulletin - Société de Chimie Biologique

Europ. J. Cancer =
European Journal of Cancer

Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem. =
Hoppe-Seylers Zeitschrift für Physiologische Chemie

J. Amer. Chem. Soc. =
Journal - American Chemical Society

JBC =
Journal of Biological Chemistry

J. Cell Biol. =
Journal of Cell Biology

J. Mol. Biol. =
Journal of Molecular Biology

Naunyn-Schmiedebergs Arch. =
Naunyn-Schmiedebergs Archiv für Experimentelle Pathologie
und Pharmakologie

PNAS =
Proceedings - National Academy of Sciences of the USA

Knut Engels
1 Berlin 33
Salzbrunner Str. 19

L E B E N S L A U F

Geburtsdatum:	30. 11. 1939
Geburtsort:	Berlin
Vater:	Josef Engels (Ingenieur)
Mutter:	Margareta Engels geb. Langer
Sept. 1945 - April 1951:	Besuch der 3. und 13. Grundschule in Berlin-Wilmersdorf
April 1951- April 1958:	Besuch der Friedrich-Ebert-Schule Berlin-Wilmersdorf bis zum Abitur
SS 1958- SS 1966:	Chemiestudium an der Freien Universität Berlin
Sept. 1966	Diplom Die Diplomarbeit wurde am Institut für Physiologische Chemie der FU Berlin angefertigt. Leiter: Professor Schütte. Der Titel der Arbeit: Kontinuierliche Messung der Tritiumaktivität im Atemwasser von Tieren nach Injektion tritiummarkierter Substanzen.
seit Okt. 1966	Doktorand im Pharmakologischen Institut der FU, Sonderforschungsbereich 29 (Embryonale Entwicklung und Differenzierung (Embryonalpharmakologie)).
seit Jan. 1970	als wissenschaftlicher Assistent.

DIFO–DRUCK SCHMACHT - BAMBERG RUF:62216